



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**Regulación transcripcional de las incretinas por  
efectores WNT y su modulación por glucosa.  
Nuevas conexiones entre diabetes y cáncer**

Ana Chocarro Calvo

Madrid, 2012







Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid

**Regulación transcripcional de las incretinas por  
efectores WNT y su modulación por glucosa. Nuevas  
conexiones entre diabetes y cáncer**

Memoria de Tesis Doctoral presentada para optar al grado de Doctor por la Licenciada  
en Biología y en Bioquímica

**Ana Chocarro Calvo**

Directora de Tesis  
Dra. Custodia García Jiménez  
Profesor Titular de la Universidad Rey Juan Carlos

Universidad Rey Juan Carlos  
Madrid, 2012



Dra. Custodia García Jiménez, Profesora Titular de Fisiología de la Universidad Rey Juan Carlos.

CERTIFICA:

Que Ana Chocarro Calvo, Licenciada en Biología y Bioquímica, ha realizado bajo mi dirección la Tesis Doctoral titulada

**“REGULACION TRANSCRIPCIONAL DE LAS INCRETINAS POR EFECTORES  
WNT Y SU MODULACION POR GLUCOSA. NUEVAS CONEXIONES ENTRE  
DIABETES Y CANCER”**

Considero que tanto el trabajo experimental realizado como las conclusiones del mismo reúnen las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid a 12 de enero de 2012.

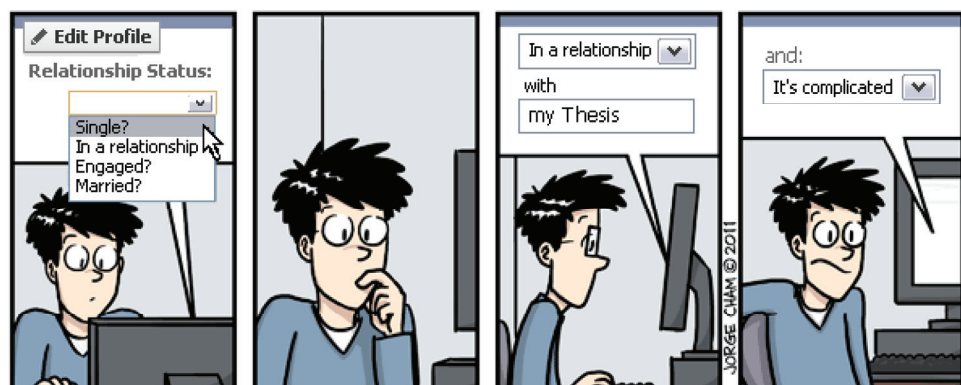
Fdo.: Dra. Custodia García Jiménez  
Directora de la Tesis Doctoral  
Profesora Titular  
Dpto. Bioquímica, Fisiología y Genética Molecular  
Facultad de Ciencias de la Salud. URJC

Fdo.: Dra. Margarita Fernández  
Tutor de la Tesis Doctoral  
Profesora Titular  
Dpto. Bioquímica  
Facultad de Medicina. UAM.













*"El experimentador que no sabe lo que está  
buscando no comprenderá lo que encuentra"*

**Claude Bernard**

*A mis padres*

*A David*



# *Agradecimientos*



Ante todo quiero agradecer a Custodia el haberme dado la oportunidad de incorporarme a su laboratorio y haber confiado en mí para llevar adelante este trabajo. Gracias por "KUSTOMIZARME" en esos interminables seminarios en la "Kuscueva" en los que me has enseñado a pensar y a diseñar cada experimento, a vivir la ciencia intensamente. Gracias por poner a mi disposición todos tus conocimientos, y como siempre digo: "espero llegar algún día a tener en la cabeza la mitad de conocimientos que tú". Por todo eso, gracias.

A mi compañero, mi "técnico", "Mí Jose"..., a quien le debo más de la mitad de esta tesis. Gracias por la ayuda experimental y por los buenos ratos que hemos pasado en el laboratorio en esos ChIP interminables y los EMSA's de libro... (bueno, los tuyos porque los míos todavía son de comic...). Gracias por aguantarme en los buenos ratos y en los peores momentos, y sobre todo gracias porque sin tu ayuda esto no habría dado frutos.

También quiero agradecer de forma muy especial la ayuda prestada a Marga Fernández, sin la que realmente toda esta aventura no habría empezado. Le agradezco la ayuda que me brindó en mis comienzos como estudiante, con su paciencia y sus explicaciones. Gracias también por la gran ayuda que me ha prestado en la última etapa de la tesis.

A mi "Primu" María y a la "Comp" y "miniComp" Cris y Yurena (ya decidís vosotras quién es quién, ahí no me meto). Gracias por los desayunos, comidas... y todo lo que hemos compartido. Gracias por el ratito de desconexión de todos los días y por tener siempre un chiste con el que arrancar una carcajada, que irrisión!! Ha sido un placer y una suerte poder compartir con vosotras, en el labo y fuera de él, tantos buenos momentos. Y a la última incorporación del grupo, Soraya, que lleva poco con nosotros pero que tiene una misión muy importante: pagar la última cuenta de la cafetería!!!!

A Dani, gracias por dejarme ser tu "padawan", a Rober que siempre está ahí cuando nuestros ordenadores de última generación nos fallan... y a Vicente con sus métodos "exquisitos". A Ángela y Nuria, con las que pude disfrutar del privilegio de tener despacho, que tranquilas estábamos allí! A Johana que no se como soporta el frío, yo me ponía un par de capas más! A Eva e Isma, gracias por todo el apoyo técnico sin el que esto no habría sido posible. Al resto del departamento de Bioquímica, Fisiología y Genética Molecular de la URJC (este nombre tan largo no me lo voy a aprender nunca!): a Miriam, Adriana, Gema, Maite y Raquel, a María Jesús, Teresa, Oscar, Antonio y a Manuel, al que le tengo que decir que este año: nos ha faltado el cocido!!! Gracias a todos porque de una u otra manera me habéis echado una mano cuando hacía falta.

Al servicio de genómica de la URJC, José Antonio y Ana, por sus "buenos días" de todas las mañanas. A la gente de la cafetería, y en especial a Nines, por tener siempre una sonrisa. Y a Robles, gracias por las risas entre pisao y pisao, creo que mi mesa nunca va a estar tan limpia!

A todos los miembros del laboratorio de Pilar, el 2.9 del IIB, ese lugar al que siempre hay algo que ir a pedir... Gracias a Pilar, a los que estaban cuando empecé y a los que aun siguen allí. En especial a Christian porque siempre ha estado dispuesto a enseñarme con infinita paciencia todo lo que hiciera falta, a Miguel y a Antonio con los que este último año he podido trabajar más de cerca, ha sido un placer. A Ana, mi primera compañera de congresos ¿te acuerdas de lo que pesaban las bolsas?, y a Garci, una pena no habernos tomado unos pintxos en Donosti, y a Marga. Gracias a todos por haber acogido a la chica de Kus!

A las chicas del B15, Susana e Irene, y en especial a Pili con quien realmente empecé a cacharrear en el labo, agradecer los buenos ratos que pasamos y todo lo que pude aprender de tí.

A todos los amigos que me adoptaron en el antiguo 1.7: Noe, Jaime, Ángelo, Eva e Isa, con los que compartí tantos desayunos y comidas y de los que últimamente me he distanciado un poco-mucho.

A la Cucu. la Cuqui y la Chary, a Irene y a Leti, a ver cuando organizamos otra Mojito Party! A Montse y Sergio, ya sabéis que tenemos una pendiente en Badajoz! A Diego, Mer, Jose, María, Javi, Rubén, Erika, Nayra, Manuel... gracias a todos!

A mis padres, quienes me dieron la oportunidad de estudiar lo que más me gusta, gracias por apoyarme siempre en todas mis decisiones, por animarme y confiar en mí desde el principio. Esta Tesis es también vuestra. A toda mi familia, porque estuvieron, están y siempre estarán a mi lado de una u otra manera. A mis abuelos, a quienes les hubiera gustado acompañarme en estos momentos.

Y por último gracias a David, muchas gracias por estar siempre a mi lado. Gracias por aguantar todas mis fases emocionales, no siempre fáciles de soportar. Gracias bichi!

*Resumen/Summary*





## RESUMEN

Los pacientes diabéticos tienen mayor riesgo de padecer ciertos tipos de cánceres caracterizados por presentar mutaciones en la vía de WNT con elevada frecuencia. Los estudios epidemiológicos relacionan las alteraciones en la vía de WNT con enfermedades metabólicas, como la diabetes, aunque se desconocen los mecanismos que las relacionan. En este trabajo exploramos las conexiones entre la señalización por la vía de WNT, las enfermedades metabólicas como la diabetes y el cáncer. La diabetes se caracteriza por una falta de control de los niveles plasmáticos de la glucosa, que da lugar a hiperglucemias, así como por presentar alteraciones en la señalización de las incretinas, hormonas intestinales que inducen la secreción de insulina y ejercen un control global del metabolismo. Nuestro trabajo demuestra que las proteínas WNT inducen la expresión génica de las incretinas en células enteroendocrinas de ratón y que los altos niveles de glucosa amplifican los efectos transcripcionales de la vía de WNT. La inducción de las incretinas por las señales WNT constituye un nuevo mecanismo que podría contribuir a las patologías metabólicas asociadas a las alteraciones de la señalización de WNT como la diabetes, a través de las incretinas.

Nuestro trabajo demuestra que los niveles elevados de glucosa inducen la retención nuclear de la  $\beta$ -catenina acumulada en el citoplasma tras la señalización por WNT. La retención nuclear de la  $\beta$ -catenina es un marcador molecular de mal pronóstico de cáncer ampliamente reconocido. La glucosa aumenta la acetilación de la  $\beta$ -catenina y con ello su retención nuclear ejerciendo acciones complementarias sobre acetil transferasas (p300) y desacetilasas (sirtuínas). El anormalmente elevado consumo de glucosa por las células tumorales puede asegurar la retención nuclear de la  $\beta$ -catenina perpetuando el fenotipo tumoral.

La retención nuclear de la  $\beta$ -catenina promovida por la glucosa resulta en un aumento global de su actividad transcripcional sobre genes reguladores del metabolismo como los de las incretinas y sobre genes críticos para la proliferación como el de la ciclina D. Los efectos proliferativos se extienden a células tumorales humanas de orígenes muy diversos.

La amplificación de la actividad oncogénica del efector de WNT ( $\beta$ -catenina) por la hiperglucemia aporta una explicación nueva para las elevadas frecuencias de cánceres asociados a la obesidad y la diabetes que se han venido justificando fundamentalmente por una señalización alterada de la insulina. La regulación de las vías de señalización asociadas a cáncer por nutrientes sin duda merece futuras investigaciones.

## **SUMMARY**

Diabetes is associated to increased cancer risk. Cancer types associated to diabetes are characterized by altered WNT signaling. Epidemiological studies now also link altered WNT signaling to metabolic diseases, such as diabetes. Despite overwhelming epidemiological data, the mechanisms that link increased cancer risk to diabetes remain obscure. In this work we explore the connections between WNT signaling, metabolic disease and cancer. Diabetes is characterized by failure in the glycaemic control, resulting in hyperglycemias and impaired incretin signaling; incretins are gut hormones that induce insulin secretion and exert a global control of the metabolism. Here we show that WNT proteins induce incretin gene expression in mouse enteroendocrine cells. We also show that increased glucose availability amplifies the transcriptional effects of WNT signaling. Induction of incretins by WNT represents a new mechanism that may contribute to the metabolic pathology associated to altered WNT signaling such as obesity and diabetes.

Our work demonstrates that high glucose levels induce nuclear retention of  $\beta$ -catenin previously accumulated in the cytoplasm upon WNT signaling. Nuclear  $\beta$ -catenin accumulation is a widely recognized marker of poor cancer prognosis. High glucose induces increased  $\beta$ -catenin acetylation which is required for nuclear retention, targeting the complementary activities of the acetylase p300 and deacetylases such as sirtuins. The abnormally high glucose uptake by tumor cells may ensure nuclear retention of  $\beta$ -catenin and perpetuate the tumor phenotype.

Glucose induced nuclear retention of  $\beta$ -catenin leads to increased transcriptional activity on genes that control the metabolism such as incretins and genes that control proliferation such as cyclin D. Thus, high glucose increases the oncogenic potential of  $\beta$ -catenin increasing its nuclear retention and its effects on proliferation. This result has been confirmed in a large variety of human derived tumor cells of various origins.

The amplification of the oncogenic activity of the WNT effector  $\beta$ -catenin by hyperglycemia offers a new mechanism to explain the increased frequency of cancer associated to obesity and diabetes in addition to impaired insulin signaling. The regulation of cancer associated signaling pathways by nutrients opens a new field for future research.

# *Índice*



<b>ÍNDICE.....</b>	<b>21</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>25</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>29</b>
<b>1. DIABETES Y CÁNCER .....</b>	<b>31</b>
1.1. Factores genéticos y ambientales en el desarrollo de las enfermedades metabólicas y del cáncer.....	32
<b>2. HORMONAS INCRETINAS.....</b>	<b>34</b>
2.1. Regulación de la síntesis y de la secreción de las incretinas.....	35
2.2. Acciones fisiológicas de las incretinas y enfermedades relacionadas.....	37
<b>3. BASES MOLECULARES DE LA RELACIÓN ENTRE LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS Y EL CÁNCER.....</b>	<b>38</b>
<b>4. LA VÍA WNT COMO POSIBLE NEXO ENTRE LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS Y EL CÁNCER.....</b>	<b>40</b>
4.1. Señalización por proteínas WNT a través de la vía canónica (WNT/ $\beta$ -catenina).....	41
4.2. Regulación de la vía de WNT.....	45
4.2.1. Regulación a nivel de los ligandos y receptores.....	45
4.2.2. Regulación a nivel de los intermediarios.....	46
4.2.3. Regulación a nivel de los efectores.....	47
• Factores TCF/LEF.....	47
• $\beta$ -Catenina.....	48
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>51</b>
<b>MÉTODOS Y RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
<b>CAPÍTULO 1: La vía WNT/<math>\beta</math>-catenina aumenta la producción de las incretinas por las células enteroendocrinas.....</b>	<b>57</b>

<b>CAPÍTULO 2: La glucosa amplifica la señalización de WNT en cáncer promoviendo la acetilación de la <math>\beta</math>-catenina.....</b>	<b>77</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>115</b>
<b>1. Mecanismo de regulación de la expresión de las incretinas GIP y GLP-1 por WNT3A o litio.....</b>	<b>117</b>
1.1. Las proteínas WNT3A se unen a sus receptores e inhiben a la GSK3 $\beta$ en células entoroendocrinas.....	117
1.2. La inhibición de la GSK3 $\beta$ por señales de WNT conduce a la estabilización de la $\beta$ -catenina.....	118
1.3. La $\beta$ -catenina actúa a través de los factores TCF/LEF para inducir la expresión de las incretinas.....	118
<b>2. Regulación de la vía de WNT por la glucosa.....</b>	<b>120</b>
2.1. La glucosa requiere la co-señalización con WNT para inducir la expresión de la incretina GIP.....	121
2.2. Las dianas transcripcionales de la glucosa son los efectores de la vía de WNT: LEF1 y $\beta$ -catenina.....	122
2.3. La glucosa altera la distribución subcelular de los efectores de WNT: LEF1 y $\beta$ -catenina:.....	123
2.4. La glucosa favorece la retención nuclear de los efectores de WNT y no su entrada al núcleo.....	123
2.5. El balance acetilación/desacetilación es el responsable de la retención nuclear de los efectores de WNT promovida por la glucosa.....	124
<b>3. Implicaciones en enfermedades metabólicas y cáncer.....</b>	<b>128</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>131</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>135</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>157</b>

# *Abreviaturas*





## CLAVE DE ABREVIATURAS

### A

AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
APC	" <i>Adenomatous Polyposi Coli</i> "
Arm	Repeticiones en armadillo
ATP	Adenosin trifosfato

### C

CBP	Proteína de unión a CREB (acetil transferasa de histonas)
CKI	Caseína quinasa-1
CREB	Proteína de unión a elementos de respuesta a AMP cíclico
CRM1	Exportina-1 (" <i>Chromosome Region Maintenance-1</i> ")

### D

DKK	" <i>Dickkopf</i> ", antagonista de WNT
DN	Dominante negativo
DPP-4	Dipeptidil-peptidasa IV
DVL	" <i>Dishevelled</i> ", proteína mediadora de la vía WNT

### F

FZD	Frizzled, receptor de la vía WNT acoplado a proteínas G
-----	---

### G

GCG	Proglucagón
GIP	Polipéptido insulínico dependiente de glucosa
GIPR	Receptor del polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP)
GLP-1	Péptido 1 análogo al glucagón
GLP-2	Péptido 2 análogo al glucagón
GLP-1R	Receptor del péptido 1 análogo al glucagón (GLP-1)
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
GSK3 $\beta$	Quinasa de la glucógeno sintasa-3 $\beta$

### H

HDAC	Desacetilasa de histonas
HMG	Grupo de alta movilidad

### I

IGF-1R	Receptor del factor de crecimiento similar a insulina-1
INE	Instituto Nacional de Estadística

### L

LRP	Receptores de la familia de proteínas relacionadas con los receptores de lipoproteínas
-----	--

## M

MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MMTV	Virus de tumor mamario de ratón (" <i>Mouse Mamary Tumor Virus</i> ")
mTOR	Proteína quinasa de serina/treonina diana de la rapamicina ("mechanistic Target Of Rapamycin")

## N

NAA	Nicotinamida
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido, forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido, forma reducida
NES	Secuencia de exportación nuclear
NLS	Secuencia de localización nuclear
NPC	Complejos del poro nuclear

## O

OMS	Organización Mundial de la Salud
-----	----------------------------------

## P

PCAF	Factor asociado a CBP/p300
PCP	Polaridad celular planar " <i>Planar Cell Polarity</i> "
PI3K	Fosfatidilinositol 3'-quinasa
PKA	Proteína quinasa A, dependiente de AMP cíclico
PKB	Proteína quinasa B
PKC	Proteína quinasa C
(Pro3)-GIP	Antagonista del receptor de GIP
p300	proteína co-activadora de peso molecular 300KDa y actividad acetil transferasa de histonas

## R

RES	Resveratrol
-----	-------------

## S

sFRP	Proteínas secretadas relacionadas con Frizzled
SIRT1	Sirtuina-1 (desacetilasa de histona o HDAC de clase III)

## T

TCF/LEF	Factor de transcripción específico de las células T/factor potenciador de linfocitos
TLE	proteínas co-represoras que forman complejos con las HDAC (" <i>Transducin-like enhancer of split</i> ")

## W

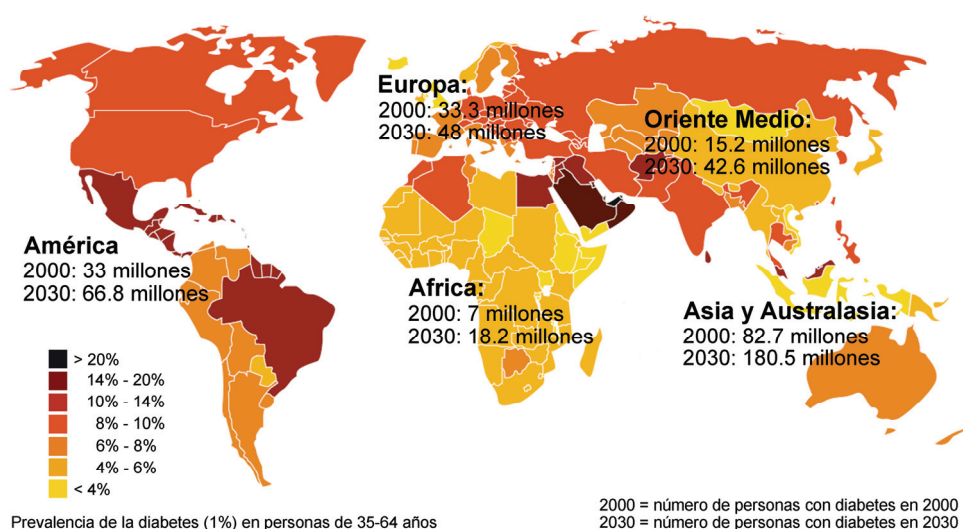
WIF-1	Factor 1 inhibidor de WNT
-------	---------------------------

# *Introducción*



## 1. DIABETES Y CÁNCER

La diabetes es un problema de salud grave y creciente a nivel mundial, que está asociado a complicaciones crónicas que influyen negativamente en la calidad y en la esperanza de vida de los individuos afectados. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha pronosticado que en el año 2030 la diabetes afectará a 370 millones de personas, lo que supone un aumento de un 114% con respecto a las últimas cifras publicadas por esta entidad correspondientes al año 2000 (235) (*figura 1*). La predisposición genética, la dieta, la inactividad física y la obesidad son los factores de riesgo mas conocidos que impulsan esta epidemia (201).

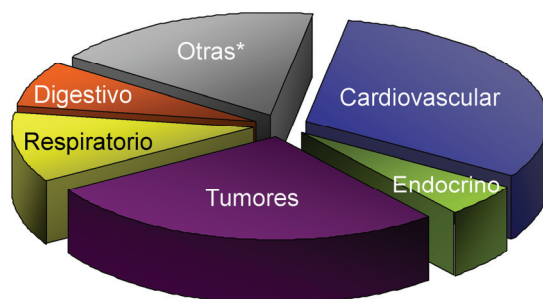


**Figura 1:** Prevalencia de la diabetes en el año 2000 y estimación para el año 2030. Fuente: <http://www.idf.org/diabetesatlas>

Las complicaciones de la diabetes reducen enormemente la calidad de vida del enfermo y suponen un enorme gasto para el Sistema Nacional de Salud. El desarrollo de retinopatía y neuropatía diabética es bastante común, y el aumento del riesgo de accidentes cardiovasculares e insuficiencia renal son bien conocidos. Los estudios epidemiológicos también asocian la diabetes a un riesgo incrementado de padecer varios tipos de cáncer incluyendo los de páncreas, hígado, mama, tracto colorrectal y órganos reproductores femeninos (218).

Estos datos son aún más impactantes si tenemos en cuenta que el cáncer y las enfermedades cardiovasculares son las principales causas de muerte en los países desarrollados. La *figura 2* representa las principales causas de muerte en España, según datos del 2009 del Instituto Nacional de Estadística (INE). Los cánceres gastrointestinales (estómago, hígado, páncreas, intestinos, *etc.*) son los que presentan mayor índice de

mortalidad, quizás por la dificultad en su detección, y además son los que con mayor frecuencia aparecen asociados a la diabetes, de acuerdo a los datos publicados por el Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III en la memoria del 2010 (23).



**Figura 2:** Principales causas de mortalidad en España. Otras\*: Sistema nervioso central, genitourinario, osteomuscular, sangre, enfermedades infecciosas/parasitarias, malformaciones congénitas, etc. Fuente: <http://www.ine.es/prensa/np664.pdf>

Las dimensiones pandémicas de la diabetes, su relación con el cáncer y la alta mortalidad de estos tumores ponen de manifiesto la necesidad de identificar nuevos marcadores que permitan diagnosticar a tiempo estas enfermedades y quizás revelen nuevas posibilidades de tratamiento. Para ello es necesario profundizar en el conocimiento de las alteraciones genéticas y/o epigenéticas que las originan y de los mecanismos y las vías de señalización alteradas.

Nuestro trabajo profundiza en el conocimiento de las relaciones entre la diabetes y el cáncer y pone de manifiesto la implicación del ambiente (hiperglucemia, quizá dieta) en la regulación de las vías de señalización implicadas en cáncer.

### **1.1. Factores genéticos y ambientales en el desarrollo de las enfermedades metabólicas y del cáncer**

El cáncer se caracteriza por un crecimiento celular incontrolado y una invasión del tejido adyacente y no adyacente sano. El proceso del desarrollo tumoral o tumorigénesis es un proceso multifásico que conlleva una serie de cambios genéticos y/o epigenéticos que confieren una ventaja selectiva, lo que lleva a una selección positiva y progresiva de las células tumorales (150). Las alteraciones genéticas seleccionadas por el ambiente, probablemente mediante modificaciones epigenéticas superpuestas, se conjugan en las células tumorales. Aunque cada tipo de tumor tiene sus características únicas, los procesos básicos por los que se originan son muy similares. Las mutaciones en los oncogenes, los genes supresores de tumores y los genes de reparación del ADN constituyen pasos críticos entre los

mecanismos moleculares que conducen al desarrollo tumoral. La regulación coordinada de todos estos genes mantiene la homeostasis de los tejidos, mientras que el proceso tumoral refleja una ruptura en ese equilibrio.

Entre los factores genéticos alterados con mayor frecuencia en el desarrollo de cáncer gastrointestinal se encuentran los genes que codifican los componentes de la vía de señalización de WNT, que se describe más adelante. Algunos de los intermediarios de la vía de WNT se consideran supresores tumorales y otros protooncogenes.

En cuanto a los factores ambientales, los estudios epidemiológicos muestran una relación entre el estilo de vida (la alimentación, el ejercicio físico) y la mortalidad y la morbilidad de diferentes enfermedades, incluido el cáncer (30, 111). La relación de estos factores con las enfermedades cardiovasculares es estrecha y, aunque no tan conocidas, se han establecido también correlaciones directas entre la diabetes y ciertos tipos de cáncer: esófago, estómago, colon y mama, como se explica a continuación. Así, el consumo de alcohol y de tabaco (81, 239), el bajo consumo de fruta, vegetales y fibra, junto con el elevado consumo de carnes rojas y un estilo de vida sedentario (238), parecen estar directamente relacionados con los aumentos en la frecuencia de cánceres del tracto digestivo. Numerosos estudios epidemiológicos asocian el aumento en la incidencia de ciertos tipos de cáncer con trastornos metabólicos como la diabetes (181) o la obesidad (38, 84). Sin embargo, todos estos trabajos son estudios epidemiológicos que establecen correlaciones observacionales y presentan importantes limitaciones. A partir de las correlaciones epidemiológicas, la investigación básica debe identificar los mecanismos afectados y los factores que los regulan para establecer las bases de una relación causa-efecto y quizás poner de manifiesto nuevas dianas para su prevención y tratamiento.

La dieta y el estilo de vida tienen un papel importante en las enfermedades metabólicas, de hecho el control de la dieta constituye una parte primordial del tratamiento; por otra parte las alteraciones genéticas implicadas son más difíciles de identificar. Aunque se han señalado numerosos polimorfismos génicos asociados a la diabetes ninguno ha servido como marcador de diagnóstico único y se ha buscado la coincidencia de varios polimorfismos candidatos para poder establecer una asociación. Esta visión ha cambiado con el descubrimiento de la fuerte asociación entre varios polimorfismos en el gen del factor de transcripción TCF7L2 (un efector de la vía de WNT) con el riesgo de padecer diabetes tipo 2 (54, 185). De hecho los polimorfismos en el gen del TCF7L2 son los únicos que hasta la fecha aparecen ligados a la diabetes tipo 2 en todas las poblaciones y etnias (120). A pesar de todo y dado que los

polimorfismos afectan a un intrón, no se conocen los mecanismos moleculares que asocian las alteraciones en los efectores de la vía de WNT a la diabetes tipo 2, por lo que podrían ser indirectos.

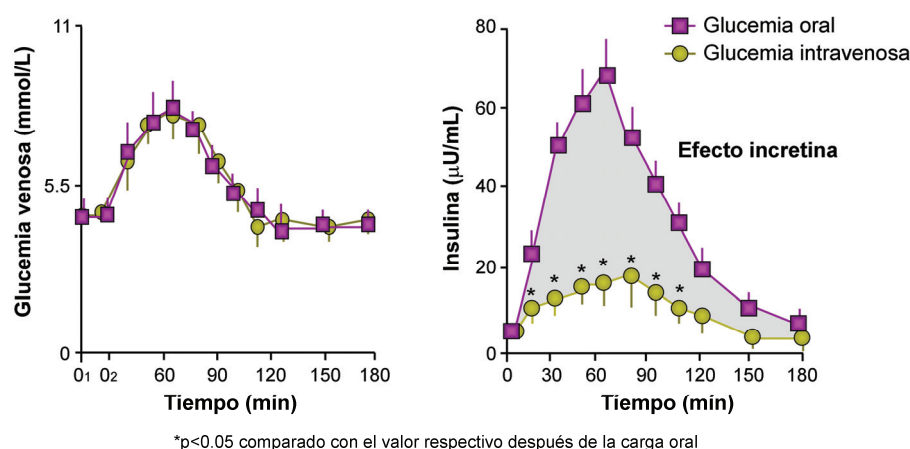
La señalización de WNT dirige el desarrollo del páncreas endocrino y modula las funciones de las células  $\beta$ , incluyendo la secreción de la insulina, la supervivencia y la proliferación (183, 190, 195, 231). Además, la vía de WNT está implicada en el correcto funcionamiento de otros tejidos que dirigen el metabolismo global. En los adipocitos las señales de WNT regulan su diferenciación (35), en el hígado regulan su función diferenciada al inhibir la gluconeogénesis y activar la glucólisis (113) y en el intestino los efectores de la vía de WNT inducen la expresión y la secreción de una incretina: el péptido 1 análogo al glucagón (GLP-1) (148, 243). El GLP-1 induce la secreción gluco-dependiente de la insulina en el páncreas (130), y su señalización sobre la célula  $\beta$  pancreática está mediada por los efectores de WNT (115). Se ha sugerido que la asociación entre los polimorfismos en TCF7L2 y la diabetes podrían ejercerse a través de las alteraciones en la hormona incretina GLP-1 (188), lo que supone que las incretinas podrían mediar los efectos de las alteraciones en la vía de WNT sobre el desarrollo de la diabetes. Sin embargo se ha demostrado que los portadores no diabéticos de los polimorfismos del TCF7L2, aunque muestran alteraciones en el efecto incretina, poseen niveles normales del GLP-1 tanto en ayunas como tras la administración de glucosa (188). Resulta más que llamativo que no se hayan medido o no se mencionen los niveles del polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) que es la incretina mayoritaria en humanos (143-144). Las incretinas juegan un papel importante en la secreción de la insulina y en la regulación del metabolismo de la glucosa, mecanismos a través de los cuales podría estar aumentando la frecuencia de cáncer en sujetos diabéticos. En este trabajo se demuestra que la vía de WNT, implicada en cáncer, gobierna la expresión no solo del GLP-1, sino también del GIP.

## **2. HORMONAS INCRETINAS**

Las incretinas son hormonas intestinales liberadas a la circulación sanguínea tras la ingesta y que estimulan la secreción de insulina pancreática de forma dependiente de la glucosa (130). Como se ve en la [figura 3](#), la administración oral de glucosa estimula la secreción de la insulina de manera más potente que su inyección por vía intravenosa (42). La diferencia se debe al denominado “efecto incretina”, por el que estas hormonas potencian la inducción por la glucosa de la secreción de insulina. El efecto incretina es responsable del 70% del total de la insulina secretada por el páncreas (146) y su descubrimiento evidenció la



estrecha relación entre el tracto gastrointestinal y el páncreas endocrino, incorporándose el concepto del eje entero-insular (213).



**Figura 3:** El efecto incretina. (Modificado de Nauck MA, et al. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63: 492-498)

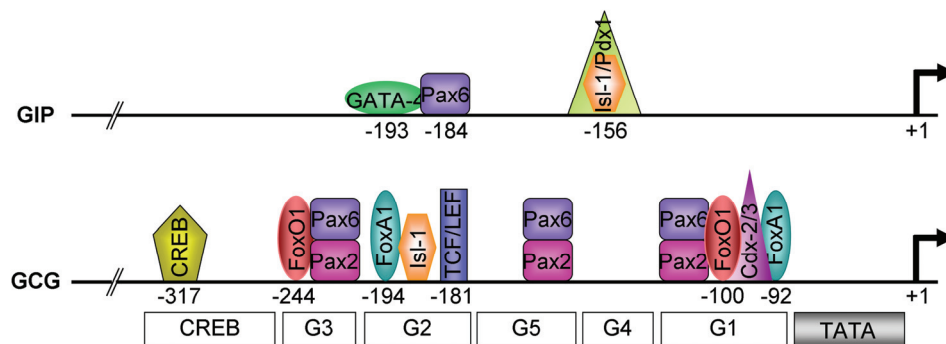
Se han identificado dos incretinas: el GIP, que es secretado por las células K enteroendocrinas localizadas principalmente en el duodeno, y el GLP-1, secretado por las células L localizadas en la región distal del tracto gastrointestinal (9). El único sistema *in vitro* capaz de producir y secretar GIP y GLP-1 son las células STC-1, procedentes de un tumor enteroendocrino de ratón (176). El trabajo que aquí presentamos se ha realizado en su mayoría utilizando este modelo *in vitro* por las ventajas que conlleva para estudiar controladamente la influencia de factores individuales.

## 2.1. Regulación de la síntesis y de la secreción de las incretinas

Las acciones de las incretinas están controladas por el adecuado mantenimiento de sus niveles (síntesis, secreción y degradación) y por la correcta señalización a través de sus receptores. Los genes de *GIP* y del proglucagón (*GCG*, precursor del GLP-1) humanos y murinos están estructuralmente muy conservados. El gen del *GIP* se expresa en células K del intestino delgado, glándulas salivares, estómago y algunas neuronas del cerebro (129). El gen del *GCG* se expresa en las células L del intestino, en las células  $\alpha$  de los islotes pancreáticos, en determinadas células gustativas de la lengua y en algunas neuronas del tronco cerebral y del hipotálamo (9). El proglucagón se procesa de manera diferente en distintos tejidos para dar lugar a una variedad de hormonas entre las que están el glucagón, el GLP-1 y el GLP-2 (péptido 2 análogo al glucagón) (39, 196).

La **figura 4** representa un esquema de los promotores del *GIP* y *GCG* y de los sitios de regulación descritos hasta la fecha. En el promotor del *GIP* murino las primeras 193 pares de bases (promotor mínimo) son suficientes para dirigir la expresión específica del gen a través de la unión de los factores de transcripción GATA-4, Isl-1, Pdx1 y Pax6 (49, 78-79). Además, el gen humano de *GIP* contiene dos sitios de respuesta a adenosín monofosfato cíclico (AMPC) denominados sitios de unión a CREB (197).

A diferencia del promotor del *GIP*, que ha despertado poco interés científico hasta el momento, el promotor del *GCG* se ha estudiado exhaustivamente porque también codifica la hormona del glucagón. Las primeras 300 pares de bases del promotor del gen de *GCG* de rata contienen el promotor mínimo (llamado G1) y otros elementos (denominados G2-G5) (165) que regulan la expresión del gen a través de la unión de distintos factores de transcripción gobernados a su vez por distintas vías de señalización, como por ejemplo CREB (40, 95), Pax-2 (177), Pax-6 (64), FoxA1(HNF-3A) (164), Cdx-2/3 (82, 103), Isl-1 (225), c-Maf (85) o FoxO1 (131, 163). La unión de los factores TCF/LEF, en respuesta al litio, a un sitio de respuesta TCF/LEF en el elemento de regulación G2, los convierte en un potente activador (específico de tejido) de la expresión de *GCG* y de la producción del GLP-1 en las células L enteroendocrinas, pero no en los islotes pancreáticos (244).



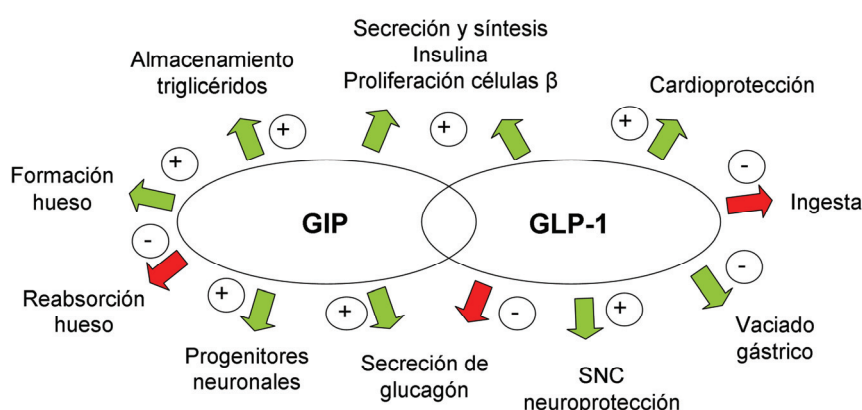
**Figura 4:** Esquema de los promotores de *GIP* y *GCG* y los sitios de regulación descritos.

La secreción de las incretinas está regulada por estímulos neuronales, hormonales y nutricionales, siendo la glucosa y la grasa sus principales inductores (159). Los niveles plasmáticos de las incretinas aumentan rápidamente tras la ingesta (43, 63) y se degradan en pocos minutos por la acción de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-4), un enzima ubicua y muy abundante en el plasma sanguíneo (132). A pesar de que la DPP-4 es una diana terapéutica contra la diabetes, se sabe muy poco acerca de los mecanismos que regulan su expresión.

## 2.2. Acciones fisiológicas de las incretinas y enfermedades relacionadas

Las acciones de las incretinas están mediadas por la interacción con sus respectivos receptores. Los receptores de GIP (GIPR) y GLP-1 (GLP-1R) pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (127) y su expresión se ha detectado en una gran variedad de tejidos (127, 230). La unión de las incretinas a sus receptores produce un incremento intracelular de AMPc activando a la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) aunque también se ha descrito la activación de otras vías de señalización como la vía de la fosfatidilinositol 3'-quinasa (PI3K) (233), dependiendo de la proteína G intermediaria.

Las acciones de GIP y GLP-1 en el eje entero-insular son complementarias pero no idénticas. Su función más conocida es la estimulación de la secreción de la insulina en las células  $\beta$  pancreáticas con la consiguiente disminución de los niveles de la glucosa en sangre (66, 130). El GLP-1 también actúa sobre el corazón (247), el estómago y el intestino (191, 214, 232), el sistema nervioso central (161-162) y los huesos (151). El GIP también actúa sobre el tejido adiposo (51, 245), el sistema nervioso central (153) y los huesos (240), como se indica en la figura 5.



**Figura 5:** Principales acciones biológicas de las incretinas.

El efecto incretina juega un papel importante en la regulación del metabolismo de la glucosa en sujetos sanos. Su señalización aparece alterada en enfermedades metabólicas como la diabetes (219) y podría contribuir al desarrollo de ciertos tipos de cáncer.

El GIP participa en la regulación metabólica de las grasas y en el desarrollo de la obesidad inducida por una ingesta excesiva en grasas (2, 128, 242), que a su vez es un factor de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2. Se han descrito cambios en la densidad y/o en el contenido de GIP de las células K del intestino de ratones obesos (48). Además, la administración de una dieta rica en grasas aumenta los niveles de RNA mensajero del GIP, así

como sus niveles plasmáticos en ratones (10). En humanos obesos los niveles de GIP están ligeramente elevados y varios estudios coinciden en que los niveles del GLP-1 están disminuidos (220). Sin embargo, en sujetos diabéticos la respuesta incretínica defectuosa se debe a una reducción de hasta el 80% de la señalización del GIP y el efecto del GLP-1 con frecuencia sigue intacto (145, 210). Sin embargo la falta de sistemática semejante en la medida de los niveles de las incretinas de los diferentes estudios dificulta su comparación y lleva a constantes contradicciones. Además, faltan estudios que analicen la evolución de los niveles de las incretinas en ayunas o tras la ingesta en individuos normales frente a los obesos y los diabéticos. Por tanto existe una necesidad de estandarizar los protocolos de medida de los niveles de las incretinas y extender estos estudios, sobre todo incluir a GIP, dadas las proporciones de la población obesa y/o diabética.

El defecto insulinotrópico del GIP en los diabéticos podría deberse a la disminución de la expresión de su receptor (GIPR) en islotes pancreáticos (118-119) o a la desensibilización del mismo (219). Un reciente estudio en humanos asocia un polimorfismo único en el gen de GIPR con el aumento de los niveles plasmáticos de glucosa, la disminución de la secreción de insulina y la disminución del efecto incretina (186). La interrupción transitoria mediante antagonistas del receptor de GIP [(Pro3)-GIP] (74-75), la ablación de las células K (2) o la eliminación genética de la acción de GIP (GIPR<sup>-/-</sup>) (137, 242) en roedores aminora la diabetes y modula la acumulación de grasa en los adipocitos, lo que probablemente conduce a la disminución de la resistencia a la insulina. Estos datos son consistentes con los obtenidos a partir de los pacientes de cirugías bariátricas que muestran una disminución en los niveles del GIP tras la cirugía (173). Estas cirugías son muy eficaces para reducir el peso así como para regular la glucemia, contribuyendo a controlar la diabetes.

### **3. BASES MOLECULARES DE LA RELACIÓN ENTRE LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS Y EL CÁNCER**

En consonancia con la implicación de la vía de WNT tanto en el cáncer como en las enfermedades metabólicas, numerosos estudios epidemiológicos demuestran una frecuencia aumentada de ciertos tipos de cáncer en los sujetos obesos (84) y en los diabéticos (166, 181). Curiosamente estos estudios no identifican a la señalización de WNT como un factor común de riesgo y llama la atención que todos ellos están caracterizados por presentar alteraciones en el metabolismo de la glucosa.

Las células tumorales también se caracterizan por presentar alteraciones metabólicas, entre las que destacan el elevado consumo de glucosa, denominado efecto “Warburg” (227). A su vez, se ha demostrado que la modulación de la ingesta tiene un impacto sobre la tumorigénesis colorrectal (94), donde el papel de WNT se conoce bien, y ello sugiere que la señalización por WNT en el intestino podría regularse por los componentes de la dieta. La glucosa induce la secreción de las incretinas (158-159) y parece lógico pensar que también regule su producción induciendo su expresión génica por se o colaborando con otras señales como WNT.

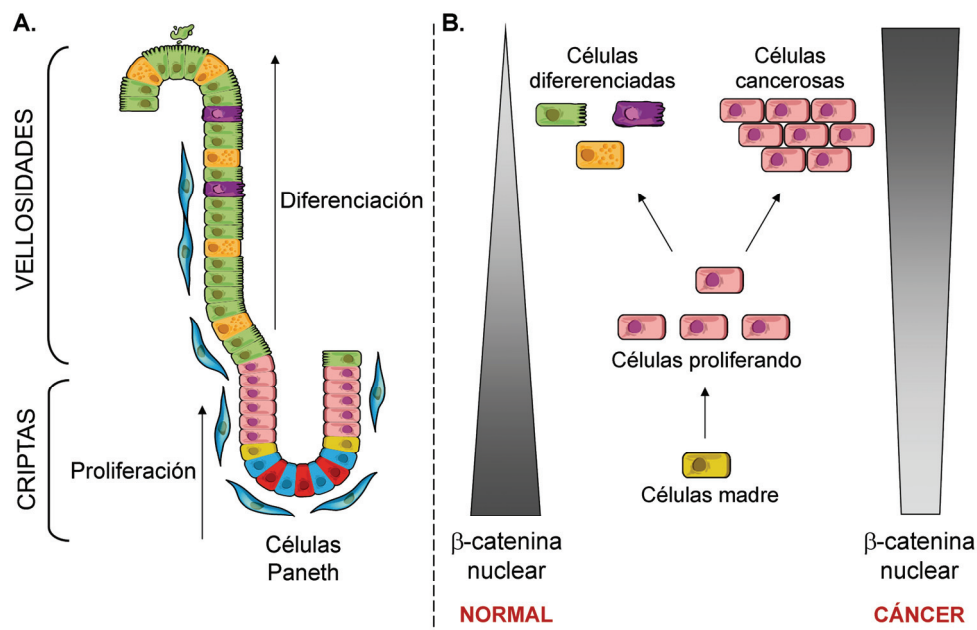
El riesgo incrementado de cáncer asociado a la diabetes se ha justificado a través de la hiperinsulinemia (169, 187). La hiperinsulinemia aparece en el estado pre-diabético como respuesta para compensar la hiperglucemia y/o la resistencia a la insulina. La administración exógena, necesaria tras el fallo de la célula  $\beta$  pancreática, y la dificultad de controlar los niveles normales conducen también a hiperinsulinemias puntuales. Algunos autores proponen que el aumento en la frecuencia de cáncer asociado a la diabetes tiene que ver con estas hiperinsulinemias, puesto que la insulina puede activar a su receptor y al receptor del factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF-1R), actuando como un factor de crecimiento para la proliferación celular (170). Sin embargo, este mecanismo puede no ser suficiente para explicar la asociación entre la hiperglucemia y el cáncer (200), entre la obesidad sin resistencia a insulina y el cáncer.

Los péptidos liberados por el tejido adiposo o las adipoquinas también pueden jugar un papel mediando el incremento en la frecuencia de cáncer en la obesidad (88) y se ha sugerido que la pérdida de peso puede reducir el riesgo de cáncer en sujetos obesos (84). Los datos más claros proceden de la reducción de peso asociada a la cirugía bariátrica que restaura el control de la glucemia (134) y reduce la tasa de cáncer (7) poniendo de manifiesto la posible relación entre la hiperglucemia y el cáncer. En conjunto, la hiperglucemia y la obesidad deberían entenderse como factores de riesgo comunes entre la diabetes y el cáncer. Tanto la hiperglucemia como la obesidad están controladas en el organismo por las incretinas que se secretan en respuesta a la ingesta de glucosa y actúan sobre los órganos más importantes en el control del metabolismo global. La señalización de las incretinas está alterada en la diabetes (145, 210) y podrían jugar un papel en cáncer, como se ha apuntado anteriormente.

En resumen, las adipoquinas, la insulina y el IGF-1 han sido hasta ahora los principales candidatos para explicar la relación entre la diabetes y el cáncer. Sin embargo la hiperglucemia y las alteraciones de la vía de WNT podrían mediar también esta relación.

#### 4. LA VÍA WNT COMO POSIBLE NEXO ENTRE LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS Y EL CÁNCER

La vía de señalización por las proteínas WNT controla el desarrollo embrionario, induciendo la proliferación y la diferenciación celular y es responsable de la renovación de los tejidos adultos (116). En el tracto gastrointestinal la vía de WNT es necesaria para el mantenimiento de las células pluripotentes (100), la maduración de las células de Paneth (217) y el desarrollo de las glándulas intestinales (101). La renovación del epitelio intestinal corre a cargo de las células troncales pluripotentes, situadas en la base de las criptas, que se dividen asimétricamente dando una célula troncal y otra célula altamente proliferativa, como se representa en la [figura 6A](#). La proliferación de estas células las empuja a lo largo del eje de cada vellosidad con lo que quedan expuestas a nuevos estímulos que determinan su progresiva diferenciación y finalmente la muerte celular programada (apoptosis) y su posterior descamación al lumen intestinal (68, 168, 172).



**Figura 6:** Funciones de la vía de WNT en las células intestinales (A) y en el desarrollo de cáncer gastrointestinal (B). (Modificado de Radtke F, et al. *Science*, 2005. 307(5717): 1904-1909 y Hoppler et al *J Cell Sci*, 2007. 120(3): 385-393)

El 90% de los tumores gastrointestinales desarrollan mutaciones en alguno de los intermediarios de la vía de WNT que conducen a una activación constitutiva de la vía y de sus genes diana, lo que determina un crecimiento celular descontrolado y la formación de tumores (52). Determinadas mutaciones en la vía de WNT conducen a la estabilización y a la acumulación de su efector (la  $\beta$ -catenina) de manera independiente de estímulo y promueven

la proliferación celular y la progresión tumoral (192), considerándose la acumulación nuclear de la  $\beta$ -catenina, una marca de actividad de la vía de WNT. Así, en el epitelio normal los niveles de la  $\beta$ -catenina nuclear son altos en las células de la base de las criptas y las células proliferativas del cuello (12, 216), mientras que no se detecta en las células que ocupan los nichos diferenciados del ápice de la vellosidad, como se representa en la [figura 6B](#) donde el gradiente gris representa los niveles nucleares de la  $\beta$ -catenina. En contraste el tejido tumoral se caracteriza por tener elevados niveles de  $\beta$ -catenina nuclear en los nichos que deberían estar ocupados por células diferenciadas (1) ([figura 6B](#)). Se han descrito numerosas mutaciones en distintos componentes de la vía de WNT que conducen a la acumulación de la  $\beta$ -catenina. La acumulación nuclear de la  $\beta$ -catenina a lo largo del eje de la vellosidad se considera un marcador de malignidad.

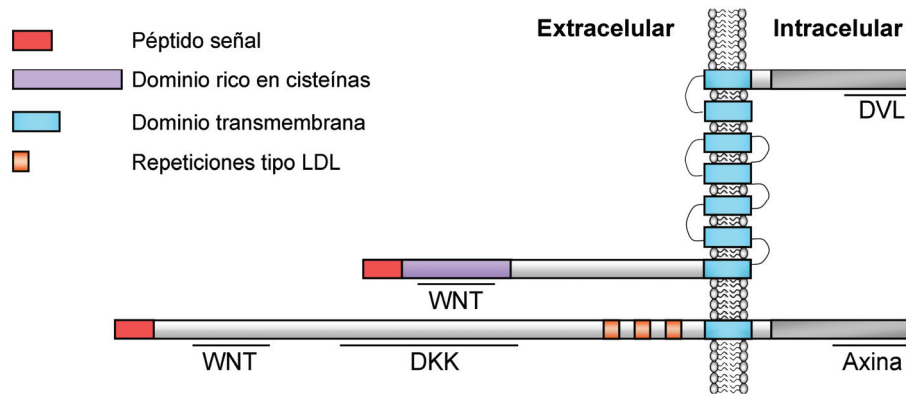
La caracterización de los mecanismos y de los factores ambientales que regulan la señalización de WNT en las células tumorales es de gran interés para el desarrollo de nuevas estrategias preventivas y terapéuticas contra el cáncer.

#### **4.1. Señalización por proteínas WNT a través de la vía canónica (WNT/ $\beta$ -catenina)**

Las proteínas WNT reconocen y se unen a receptores de membrana de la familia Frizzled (FZD). Los FZD son receptores acoplados a las proteínas G con un dominio rico en cisteínas que interacciona con los ligandos WNT (37), una región hidrofóbica que contiene los siete dominios transmembrana (226) y un dominio C-terminal citoplásmico que interacciona con la proteína Dishevelled (DVL) (34) y con las proteínas G (224), como se representa en la [figura 7](#). El complejo WNT/FZD puede señalizar por sí solo o asociarse a co-receptores con un único dominio transmembrana de la familia LRP (proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas) también esquematizado en la [figura 7](#). En vertebrados se han descrito dos tipos: LRP5 y LRP6 (60), que se caracterizan porque en su región extracelular poseen varios dominios de interacción con proteínas reguladoras (167, 204) relacionadas con las proteínas WNT, como Dickkopf (DKK) y las proteínas solubles relacionadas con los receptores Frizzled (sFRP).

Dependiendo del tipo de receptor(es) y de los intermediarios posteriores reclutados, las proteínas WNT pueden señalizar a través de distintas vías. La unión de WNT a FZD-1 y LRP5/6 activa la vía canónica (dependiente de  $\beta$ -catenina), mientras que las vías no canónicas WNT/ $\text{Ca}^{2+}$  (97) y WNT/PCP (Polaridad celular planar) son independientes de los receptores LRP (24, 133).





**Figura 7:** Esquema de los receptores de las proteínas de WNT.

Las mutaciones en los intermediarios de la vía canónica o WNT/ $\beta$ -catenina, cuyo efector principal es la  $\beta$ -catenina están asociadas a varios tipos de cáncer. La señalización a través de la vía canónica implica la interacción secuencial de (1) los ligandos WNT con sus receptores FZD; (2) la formación del complejo de co-receptores FZD-LRP; (3) la interacción de éstos con la proteína DVL; (4) las interacciones de estos con el complejo de degradación de la  $\beta$ -catenina, que se describe más adelante, y su desmantelamiento. Como consecuencia se acumula la  $\beta$ -catenina que entra al núcleo, se une a los factores de transcripción TCF/LEF (factor de transcripción específico de las células T/factor potenciador de linfocitos) y promueve la activación transcripcional de los genes diana de la vía.

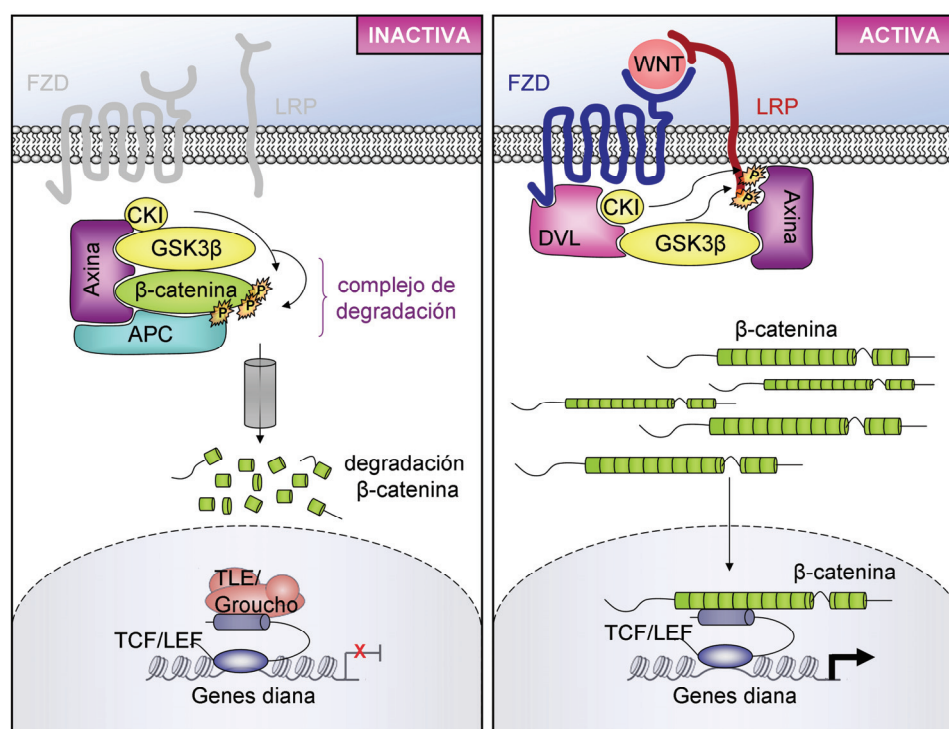
La proteína citosólica DVL regula la vía canónica uniendo el complejo WNT/FZD/LRP al complejo de destrucción de la  $\beta$ -catenina. DVL puede interaccionar con distintas proteínas a través de tres dominios conservados, constituyendo un punto de ramificación y activando otras vías de señalización por proteínas WNT independientes de receptores LRP, como la vía WNT/PCP y la WNT/ $\text{Ca}^{2+}$  (223). En la vía canónica la interacción WNT/FZD/LRP/DVL conduce a la desestabilización del complejo de degradación de la  $\beta$ -catenina (27). El reclutamiento de los co-receptores LRP activados por el complejo WNT/FZD provoca la fosforilación secuencial de éstos por la caseína quinasa 1 (CKI $\alpha$ ) y la quinasa de la glucógeno sintasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) en su región citoplasmática, creando sitios de unión para la axina y promoviendo un cambio conformacional del complejo de degradación que permite la liberación de la  $\beta$ -catenina (250).

En ausencia de las proteínas WNT la  $\beta$ -catenina forma parte de las estructuras de adhesión célula-célula (uniones adherentes) que une las cadherinas al citoesqueleto a través de la  $\alpha$ -catenina (87, 141) y la  $\beta$ -catenina citoplásmica se degrada mediante el complejo de



degradación (27). Uno de los pasos limitantes de la vía canónica consiste en inhibir la degradación de la  $\beta$ -catenina.

El complejo de degradación está formado por proteínas con funciones estructurales como la Axina y APC (*Adenomatous polyposi coli*) implicadas en el ensamblaje o el desmantelamiento del complejo (105), aunque quizás al unirse a la  $\beta$ -catenina también regulen su localización núcleo-citoplásmica (28, 147) gracias a sus secuencias de localización nuclear (NLS) y de exportación nuclear (NES). Además de las proteínas Axina y APC, el complejo de degradación posee proteínas con actividad quinasa como la CKI $\alpha$  y la GSK3 $\beta$  que fosforilan secuencialmente a la  $\beta$ -catenina (112). La fosforilación de la  $\beta$ -catenina por la CKI $\alpha$  (3) es necesaria para su posterior fosforilación por la GSK3 $\beta$ , que a su vez promueve su ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma (155). Las interacciones entre todos los componentes del complejo de degradación son bastante complejas e incluyen diversas fosforilaciones de varios componentes que favorecen o inhiben su ensamblaje funcional. La [figura 8](#) presenta una visión global de la cascada de activación de la vía canónica activada por los ligandos de WNT.



**Figura 8:** Representación de la vía canónica (WNT/ $\beta$ -catenina) inactiva y activa.

La unión de las señales de WNT al complejo receptor desencadena una serie de acontecimientos que desestabilizan el complejo de degradación y resultan en la

deslocalización de la  $\beta$ -catenina, su acumulación citosólica y su paso al núcleo (52), donde se une a los factores de transcripción TCF/LEF (13) desplazando a los co-represores transcripcionales TLE (proteínas co-represoras que forman complejos con HDAC)/Groucho e iniciándose la transcripción de los genes diana (c-myc, Ciclina D, etc.) implicados en proliferación (59, 194, 207).

Las proteínas TCF/LEF son factores de transcripción con dominios de unión al ADN del tipo HMG (grupo de alta movilidad) (212), que se caracterizan por unirse al surco menor del ADN. Los factores TCF/LEF se comportan como represores constitutivos de la expresión génica al estar unidos a los co-represores TLE/Groucho (21). La unión de la  $\beta$ -catenina desplaza a los co-represores y convierte a los factores TCF/LEF en activadores transcripcionales de los genes diana (17) actuando como uno de los más potentes co-activadores conocidos.

En humanos se conocen cuatro genes de la familia TCF/LEF: TCF7 (conocido como TCF1), LEF1, TCF7L1 (antes TCF3) y TCF7L2 (antes TCF4). En los últimos años se han identificado más de 50 genes susceptibles de ser regulados por los complejos de la  $\beta$ -catenina-TCF/LEF en *Drosophila*, *Xenopus* y ratón. La figura 9 presenta un resumen de los genes regulados por WNT/ $\beta$ -catenina e implicados en el desarrollo del cáncer gastrointestinal (31, 46, 53, 58-59, 80, 92, 96, 99, 124, 136, 149, 179, 194, 207, 234, 252).

	GEN	FUNCIÓN	Referencia
FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	c-Myc	Proliferación	He, 1998
	TCF-1	Diferenciación	Roose, 1999
	LEF1	Diferenciación	Filali 2002
	PPARdelta	Proliferación/Diferenciación	He, 1999
	c-jun	Proliferación/Diferenciación	Mann, 1999
	ITF-2	Proliferación/Diferenciación	Kolligs, 2002
OTRAS DIANAS	uPAR	Adhesión/Migración/Invasión	Mann, 1999
	matrilisina	Invasión/Migración	Crawford, 1999
	Axina-2	Degradación $\beta$ -catenina	Jho, 2002
	Dickkopf	Proliferación/Diferenciación	Niida 2004; Gonzalez-Sancho 2004
	Ciclina D1	Proliferación	Tetsu, 1999; Shtutman, 1999
	Gastrina	Proliferación	Koh, 2000
	CD44	Adhesión	Wielenga, 1999
	BMP4	Diferenciación	Kim, 2002
	claudina-1	Adhesión	Miwa, 2002
	VEGF	Proliferación	Zhang, 2001

**Figura 9:** Ejemplo de genes diana de WNT/ $\beta$ -catenina implicados en el desarrollo de cáncer gastrointestinal.

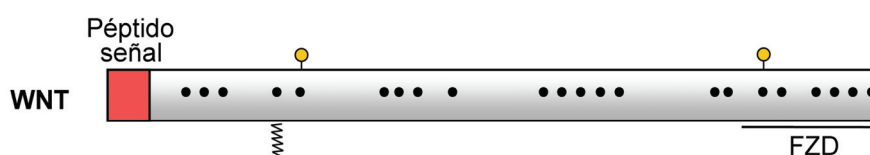
En resumen, además de los estudios epidemiológicos que relacionan las alteraciones en la vía de WNT con las enfermedades metabólicas, numerosas evidencias relacionan la vía de WNT/ $\beta$ -catenina con el mantenimiento y la renovación del epitelio intestinal y sus alteraciones con el desarrollo de cáncer. De lo anteriormente expuesto se concluye que la regulación de esta vía es extremadamente importante para mantener una renovación tisular compatible con el mantenimiento de la homeostasis.

## 4.2. Regulación de la vía de WNT

El control estricto de los patrones de expresión temporal y espacial de las proteínas WNT y de proteínas relacionadas (ver la [figura 11](#) en la página siguiente) así como la regulación de los intermediarios de su señalización es fundamental para el correcto funcionamiento de la vía. A pesar de que se han identificado muchos componentes, todavía estamos lejos de comprender los factores y procesos que regulan la vía de WNT y la especificidad de su señal.

### 4.2.1. Regulación a nivel de los ligandos y receptores

Las proteínas WNT forman una gran familia de ligandos codificados a partir de una familia de protooncogenes presentes desde las anémonas hasta los humanos. El primer oncogén de la familia WNT, *Int-1*, se identificó por su habilidad para formar tumores de mama en ratones cuando se activaba a través de la integración del virus MMTV (Virus de tumor mamario de ratón). Este oncogén, resultó ser el homólogo del gen *Wingless* de *Drosophila*, y se renombró como una combinación de ambos nombres: Wnt-1 (152); los homólogos de los genes *Wnt* de ratones también se denominaron WNT en humanos.

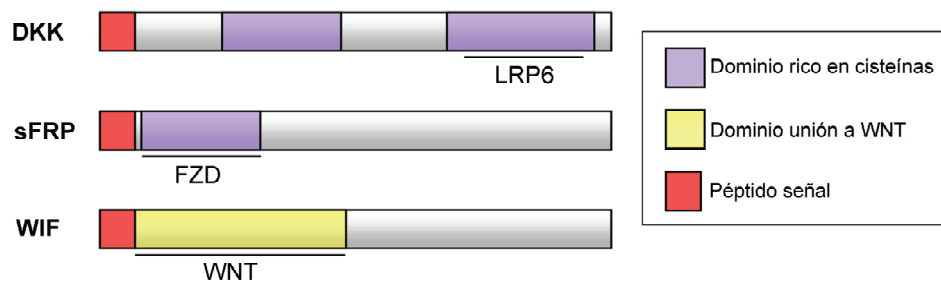


**Figura 10:** Esquema de las proteínas WNT. Aparecen representados los dominios ricos en cisteína (puntos), los residuos glicosilados (●) y palmitoilados (⚡), el dominio de interacción con el receptor FZD y el péptido señal.

Las proteínas WNT son moléculas hidrófobas, secretadas por las células no diferenciadas, las células inflamatorias y los adipocitos, gracias a un péptido señal (133). Los ligandos WNT se asocian a las membranas celulares a través de las palmitoilaciones (236) y a la matriz extracelular a través de las glicosilaciones (174) típicas de sus múltiples residuos de cisteína y necesarias para su función (133). Las proteínas WNT actúan como señales autocrinas o

paracrinas, aunque no se descarta un posible papel endocrino a distancias mas largas (14, 20, 114, 209). Los dominios y las características más importantes de las proteínas WNT aparecen esquematizados en la [figura 10](#).

La producción, maduración y secreción de las proteínas WNT no son los únicos puntos de control de su señalización. La unión de las proteínas WNT a sus receptores, y en consecuencia su señalización, está regulada extra-celularmente por proteínas secretadas que las secuestran (como el factor 1 inhibidor de WNT o WIF) o por proteínas que compiten como antagonistas por sus receptores (como las proteínas DKK y las proteínas solubles sFRP) (86). En la [figura 11](#) hemos esquematizado la estructura de estos reguladores poniendo de manifiesto los dominios más importantes en su control de la señalización de WNT.



**Figura 11:** Esquema de los inhibidores de la vía de WNT.

Las proteínas WNT, sus inhibidores solubles y los receptores se expresan con patrones tejido-específicos muy regulados. Aunque está claro que los ligandos y sus inhibidores se pueden unir a distintos receptores de WNT se sabe poco acerca de la expresión, el tráfico y la endocitosis y la des-sensibilización de estos. Las interacciones entre los ligandos y los antagonistas de sus receptores son muy complejas y aun se necesita mucho trabajo para entender la regulación de la señalización de WNT a este nivel (90).

#### 4.2.2. Regulación a nivel de los intermediarios

Las interferencias de la vía de WNT con otras vías proporcionan oportunidades para coordinar, ajustar y afinar los niveles de activación y represión transcripcional, así como su duración, de manera específica en los distintos tipos celulares y en respuesta a diferentes estímulos. La señalización de WNT modula y es modulada por otras vías de señalización implicadas en cáncer, como la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) ERK (249) y p38 (26, 32). Así, la quinasa GSK3 $\beta$  fosforila, además de a la  $\beta$ -catenina a una gran variedad de sustratos como las enzimas metabólicas (Ej. la glucógeno sintasa) o los factores de transcripción (CREB, c-Myc y c-Jun), que son efectores de otras vías de

señalización, promoviendo su salida del núcleo o la disminución de su unión al DNA y en consecuencia su actividad transcripcional. Por otro lado, la  $\beta$ -catenina se une y modula la actividad de efectores de otras vías como las proteínas Smads en respuesta a la señalización por TGF $\beta$  (107) o los factores de transcripción FoxO1 (44, 67) efectores de la vía de PTEN/PI3K/AKT (160).

A su vez los intermediarios transduccionales de WNT (GSK3 $\beta$ ,  $\beta$ -catenina y TCF/LEF) son diana de otras vías implicadas en cáncer, como la vía de PI3K/Akt (142, 193), la vía de la MAPK p38 (16, 208) y la vía de la proteína quinasa C (PKC) (29), que inhiben a la GSK3 $\beta$ , o la vía de la PKA que inactiva a la GSK3 $\beta$  (203) e independientemente estabiliza a la  $\beta$ -catenina (205).

#### 4.2.3. Regulación a nivel de los efectores

Dividiremos los efectores de la señalización de WNT en los factores de transcripción de la familia TCF/LEF y el co-activador:  $\beta$ -catenina.

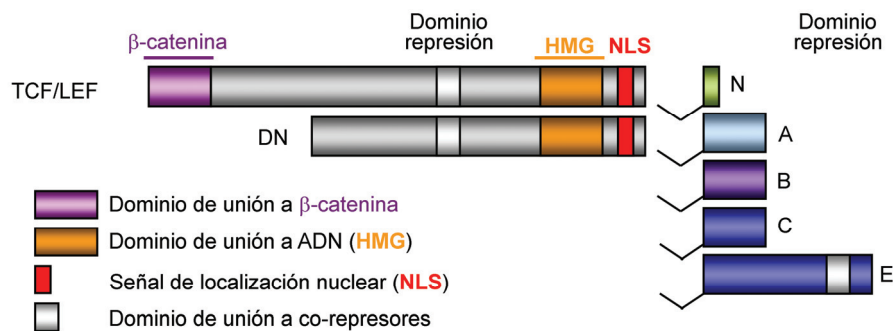
- Factores TCF/LEF

Los factores de transcripción de la familia de TCF/LEF se expresan abundantemente durante el desarrollo embrionario y su expresión disminuye o se silencia en la mayoría de los tejidos adultos, salvo en los tejidos con una alta tasa de renovación que contienen poblaciones de células troncales en continuo crecimiento y diferenciación, como las criptas del colon e intestino (11, 100, 175, 253).

La estructura de los factores TCF/LEF se esquematiza en cuatro dominios funcionales representados en la [figura 12](#): un dominio N-terminal de unión a la  $\beta$ -catenina (13) que mediará su acción activadora de la transcripción; un dominio central de interacción con co-represores que median su actividad represora de la transcripción; un dominio de unión al DNA del tipo HMG (212) seguido de una señal NLS y una cola C-terminal variable (41, 69, 215). Algunos miembros de la familia TCF/LEF se pueden transcribir a partir de dos promotores alternativos (69, 215). El primer promotor dirige la transcripción de un RNA mensajero que codifica para la proteína entera (TCF o LEF), mientras que el segundo produce una forma trunca carente del dominio de unión a la  $\beta$ -catenina pero que conserva los dominios de interacción con los co-represores y con el ADN y por tanto se comporta como un represor constitutivo, representado en la [figura 12](#) como "dominante negativo" (DN), es decir silencia los genes diana y no responde a la activación de la vía por WNT (69). La única

manera de activar los genes ocupados por estos "dominantes negativos" sería la competición con la forma completa si se expresara de manera más abundante. El uso de diferentes promotores para la transcripción de los genes o el procesamiento (*"splicing"*) alternativo dan lugar a distintas isoformas de los factores con actividades a veces opuestas.

A pesar de su homología los factores TCF/LEF no son completamente intercambiables o redundantes entre sí. El equilibrio en la expresión relativa de los distintos miembros e isoformas de los factores TCF/LEF determinan la intensidad y la especificidad de la respuesta a las señales de WNT (5, 228). La comparación de la expresión de los factores TCF/LEF y de su actividad en el intestino normal y en carcinomas de colon sugiere que las cantidades relativas de cada isoforma cambian a medida que avanzan los tumores, lo que puede influir en la activación de los genes diana relacionados con la diferenciación y la progresión tumoral y con la especificidad de la señal de WNT en el núcleo (229). Aunque el mecanismo responsable de los cambios de expresión entre las isoformas TCF/LEF no se conoce aún, la misma señalización WNT podría regular estos factores (180) ya que los promotores de los factores TCF/LEF contienen elementos de respuesta a WNT (70).



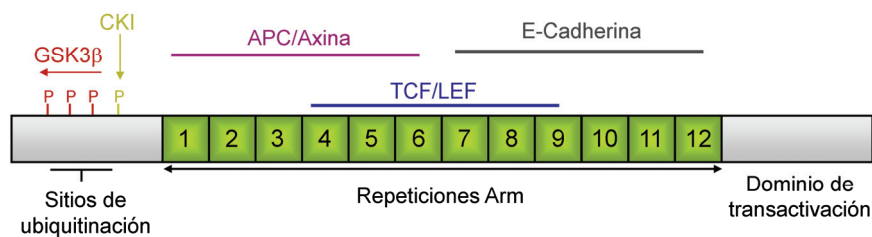
**Figura 12:** Esquema de los dominios conservados de los factores TCF/LEF y de su diversidad.

La regulación de las proporciones relativas entre las distintas isoformas, de su afinidad relativa por los elementos de unión en distintos promotores y de las diferencias de afinidad relativa por la  $\beta$ -catenina u otras proteínas que modulen su actividad o localización suponen un apasionante campo de investigación.

- $\beta$ -Catenina

Las mutaciones en el exón 3 del gen de la  $\beta$ -catenina, que le permitirían “escapar” del control del complejo de degradación (76, 135, 182, 199), se consideran un evento temprano en la carcinogénesis (15).

La  $\beta$ -catenina, como principal característica estructural, presenta 12 repeticiones denominadas en Armadillo (Arm) por la homología con su ortólogo *Armadillo* en *Drosophila*. Las repeticiones Arm contienen los sitios de unión de  $\beta$ -catenina con APC, las cadherinas y los miembros de la familia de los factores de transcripción TCF/LEF (241), como se esquematiza en la [figura 13](#). La región amino-terminal de la  $\beta$ -catenina es importante para la regulación de su estabilidad, mientras que la región carboxi-terminal posee un dominio de activación transcripcional extremadamente potente (241). Como se explica en el apartado 4.1 las fosforilaciones secuenciales de la  $\beta$ -catenina son necesarias para su ubiquitinación y degradación en el proteasoma, las mutaciones en la Ser45 (fosforilada por la CKI) inhiben las fosforilaciones posteriores en residuos de la región amino-terminal, por la GSK3 $\beta$  (112) y su degradación. Una vez acumulada en el citoplasma la actividad transcripcional de la  $\beta$ -catenina depende de sus interacciones con diversas proteínas que afectan a su estabilidad, conformación, localización y/o actividad transcripcional ya que la  $\beta$ -catenina no contiene secuencias NLS ni NES ni dominios de unión al ADN.



**Figura 13:** Estructura de la  $\beta$ -catenina. Sitios de unión de la  $\beta$ -catenina con APC, las cadherinas y los miembros de la familia TCF/LEF y los residuos regulables por fosforilación (P).

El mecanismo que establece el paso de la  $\beta$ -catenina del citoplasma al núcleo no está claramente establecido. El sistema clásico de importación de proteínas al núcleo se basa en la interacción de un dominio rico en aminoácidos básicos (NLS), con las importinas  $\alpha$  y  $\beta$  y con los complejos proteicos del poro nuclear (NPC) (154, 221). El mecanismo de exportación se basa en la interacción de un dominio rico en leucinas (NES) con el receptor CRM1/exportina1 (*Chromosome Region Maintenance 1*) (198). La  $\beta$ -catenina carece de señales NLS y NES (45) y por tanto su tráfico núcleo-citoplasma ha de ser independiente de ellas. Varios trabajos han descrito que la translocación nuclear de la  $\beta$ -catenina es dependiente del factor de transcripción LEF1 que posee una secuencia clásica NLS (71, 93) mientras que otros presentan evidencias de que es la  $\beta$ -catenina la que actúa como importador nuclear de LEF1 (6), siendo este punto todavía bastante controvertido en la investigación de la vía de WNT/ $\beta$ -catenina. La interacción directa de la  $\beta$ -catenina con los componentes del NPC a través de sus



repeticiones Arm 10-12 y su dominio C-terminal (98) podrían mediar su paso al núcleo (202, 246) y su salida estaría mediada por la unión directa a CRM1 (89).

A pesar de esta unión directa, el paso al núcleo ha de estar regulado. Recientemente distintos trabajos han descrito la regulación de la localización celular de la  $\beta$ -catenina por modificaciones postraduccionales, como las acetilaciones en residuos de lisina. Estos trabajos sugieren que las acetil transferasas: CBP (proteína de unión a CREB) y p300 (19, 61, 108) así como el factor asociado a ellas denominado PCAF (50) favorecen la localización nuclear de la  $\beta$ -catenina y un aumento en su actividad oncogénica. Otros trabajos sugieren que la desacetilación de la  $\beta$ -catenina por la familia de las sirtuinas reduce su potencial oncogénico (19, 47). Sin embargo mientras que la sobre expresión exógena de la p300 puede forzar su interacción con la  $\beta$ -catenina y promover la acetilación de esta (61, 102, 108) no se han identificado las señales fisiológicas que regulan las interacciones de la  $\beta$ -catenina con la CBP/p300 o las sirtuinas, o su acumulación nuclear.

La investigación futura debe aclarar la contribución de cada uno de estos mecanismos a la retención nuclear de la  $\beta$ -catenina característica de los tumores y sobre todo cuáles son las señales ambientales que controlan dichos mecanismos.

En resumen, las alteraciones de la vía de WNT relacionadas con el cáncer están bien estudiadas aunque faltan por conocer muchos detalles moleculares. Los estudios epidemiológicos recientes sugieren también que la vía de WNT juega un papel importante en el control del metabolismo global, pero no se conocen los mecanismos implicados.

Nuestro trabajo representa un avance en el campo porque contribuye a esclarecer las relaciones entre la vía de WNT, el control metabólico y el cáncer de dos maneras. Desde un punto de vista mecanístico identifica nuevas dianas de la glucosa con capacidad para perpetuar el fenotipo tumoral. Desde un punto de vista general podría contribuir a prevenir el riesgo incrementado de padecer cáncer entre los diabéticos.



# *Objetivos*



## OBJETIVOS

1. Análisis de la regulación de la expresión de las incretinas por la vía de WNT en células enteroendocrinas.
  - Mapeo de los promotores de *GIP* y *GCG* e identificación de los sitios funcionales de regulación por WNT.
  - Disección de los factores y de los mecanismos implicados en la activación de la expresión de las incretinas por señales WNT.
2. Estudio de la modulación de la señalización de WNT por glucosa.
  - Análisis de los efectores de la vía de WNT implicados
  - Disección de los mecanismos involucrados.
  - Extensión de nuestros resultados a otros sistemas: células tumorales humanas no endocrinas de diversos orígenes.



# *Métodos y Resultados*



# WNT/ $\beta$ -CATENIN INCREASES THE PRODUCTION OF INCRETINS BY ENTERO-ENDOCRINE CELLS

---

Artículo publicado en:

**Diabetología**

(2009). Vol. 52(9): 1913-1924

JM GARCIA-MARTINEZ

A CHOCARRO-CALVO

CM MOYA

C GARCIA-JIMENEZ





## INTRODUCCIÓN AL CAPÍTULO 1

### **La vía WNT/ $\beta$ -catenina aumenta la producción de las incretinas por las células enteroendocrinas.**

En este trabajo hemos analizado si la señalización por la vía de WNT regula la producción de las dos incretinas (GIP y GLP-1) a nivel transcripcional. Las incretinas participan en la regulación del metabolismo global y muchos de sus tejidos diana como páncreas o tejido adiposo, están gobernados por la señalización de la vía de WNT. Las alteraciones en la señalización por WNT y por las incretinas están asociadas con enfermedades metabólicas como la obesidad y la diabetes pero no se conoce si existe una relación causa-efecto entre ellas. Nuestro trabajo es importante porque demuestra que las proteínas WNT inducen la expresión génica de las dos incretinas.

Para estudiar si las incretinas se regulan transcripcionalmente por WNT hemos clonado los promotores de *GIP* y de *GCG* y hemos usado la línea celular enteroendocrina STC-1 de ratón como modelo. Hemos identificado nueve sitios teóricos de regulación por WNT en el promotor de *GIP* y seis en el de *GCG* y hemos caracterizado su funcionalidad. Hemos diseccionado la vía e identificado los intermediarios implicados. Nuestros resultados indican que la señalización por WNT aumenta la producción transcripcional de ambas incretinas en las células enteroendocrinas. Los efectores de WNT actúan a nivel transcripcional a través de un elemento de respuesta específico localizado en el promotor proximal de *GIP* y conservado en los promotores humanos y murinos, así como en el promotor de *GCG*.

La obesidad y la diabetes están asociadas a alteraciones en los efectores de WNT, a incrementos en los niveles de GIP y a una disminución del efecto incretina; nuestro trabajo identifica a las incretinas como nueva conexión y potenciales mediadoras entre las alteraciones en la señalización por WNT y estas enfermedades metabólicas.



# WNT/ $\beta$ -catenin increases the production of incretins by entero-endocrine cells

J. M. García-Martínez · A. Chocarro-Calvo ·  
C. M. Moya · C. García-Jiménez

Received: 17 February 2009 / Accepted: 21 May 2009 / Published online: 7 July 2009  
© Springer-Verlag 2009

## Abstract

**Aims/hypothesis** Glucose-dependent insulintropic peptide (GIP) plays a pivotal role in the regulation of glucose homeostasis. Rates of diet-induced obesity, insulin resistance and type 2 diabetes are decreased when GIP signalling is disturbed in mice, suggesting that GIP plays a role in the onset of type 2 diabetes. WNT signalling is linked to type 2 diabetes and induces synthesis of the other incretin, glucagon-like peptide 1 (GLP-1). GLP-1 analogues improve treatment of type 2 diabetes patients in whom GLP-1 signalling is intact and have captured clinical attention. GIP levels are altered at the onset of type 2 diabetes and later on, while GIP signalling is impaired. Thus, GIP is not a candidate for treatment but might be an important target from a prevention perspective. Hypothesising that hypersecretion of GIP links altered WNT signalling to the onset of type 2 diabetes, we sought to determine whether WNT signalling induces GIP production by entero-endocrine cells.

**Methods** RT-PCR and chromatin immunoprecipitation (ChIP) were used to study *Gip* gene induction. *Gip* promoter

elements mediating WNT/lithium induction were identified (electrophoretic mobility shift assay, co-transfection of deletion mutants, ChIP).

**Results** Lithium or WNT/ $\beta$ -catenin signalling enhanced GIP production by entero-endocrine cells through a conserved site in the proximal *Gip* promoter. Lithium favours lymphoid enhancer factor-1/ $\beta$ -catenin binding to *Gip* promoter and diminishes ChIP through T cell factor-4 and histone deacetylase 1.

**Conclusions/interpretation** Lithium and WNT are incretin inducers in general. This work provides a novel link between WNT signalling, obesity and diabetes.

**Keywords**  $\beta$ -Catenin · Chromatin · Diabetes · Glucose-dependent insulintropic peptide · Incretin · Lithium · Obesity · WNT

## Abbreviations

ChIP	Chromatin immunoprecipitation
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
GIP	Glucose-dependent insulintropic peptide
GLP-1	Glucagon-like peptide 1
GSK3 $\beta$	Glycogen synthase kinase 3 $\beta$
HDAC1	Histone deacetylase 1
LEF	Lymphoid enhancer factor
TCF	T cell factor

J. M. García-Martínez and A. Chocarro-Calvo contributed equally to this work.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00125-009-1429-1) contains supplementary material, which is available to authorised users.

J. M. García-Martínez · A. Chocarro-Calvo ·  
C. García-Jiménez (✉)  
Dptal I. Despacho 020, Facultad de Ciencias de la Salud,  
Universidad Rey Juan Carlos,  
28922 Alcorcón, Madrid, Spain  
e-mail: custodia.garcia@urjc.es

C. M. Moya  
Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),  
Madrid, Spain

## Introduction

Incretins are hormones that enhance insulin secretion in response to an oral glucose load. Glucose-dependent insulintropic peptide (GIP) and glucagon-like peptide 1 (GLP-1), produced along the small intestinal epithelium,

are the major incretins. Up to 80% of total insulin secreted after an oral load of glucose is due to incretin action [1, 2]. GIP is a 42 amino acid peptide that has a half-life of 5 to 7 min, and induces insulin secretion by pancreatic  $\beta$  cells, triacylglycerol synthesis/storage by adipocytes and also adipokine secretion (leptin, resistin) [3]. GIP plays a major role in obesity induced by overnutrition [4–7], which often leads to type 2 diabetes. GIP function is controlled by maintaining adequate levels (synthesis and secretion) and signalling through its specific receptor, GIP receptor (GIPR). *Gipr*<sup>-/-</sup> mice exhibit severe glucose intolerance after an oral glucose load [8]. Long-term GIP signalling inhibition protects *Gipr*<sup>-/-</sup> mice from age-associated insulin resistance [9]. Compared with controls, *Gipr*<sup>-/-</sup> mice exposed to chronic nutritional excess do not become obese [10]. Indeed, GIP has now become a potential target for anti-obesity and anti-diabetes drugs [11]. Strong association of *Tcf7l2* variants (effectors of WNT signalling) with type 2 diabetes established a genetic linkage between diabetes and WNT signalling (see Welters et al. [12] and references therein). *Tcf7l2* is a T cell factor (TCF)/lymphoid enhancer factor (LEF) that regulates adipogenesis and GLP-1 production, suggesting a link with incretin action [12]. TCF/LEF factors repress transcription by targeting co-repressors such as histone deacetylase 1 (HDAC1), to their binding site.  $\beta$ -Catenin binding converts TCF/LEF factors into potent activators, displacing co-repressors and recruiting histone acetylases and co-activators.  $\beta$ -Catenin enters the nucleus following cytoplasmic accumulation when the priming enzyme for its ubiquitination and degradation, glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), is inhibited (for reviews see Clevers [13] and Roose and Clevers [14]). WNT signalling leads to GSK3 $\beta$  inhibition, soluble  $\beta$ -catenin accumulation and TCF/LEF-dependent transcriptional activation [13, 14]. Complexity and instability of WNT proteins often led to use of LiCl to inhibit GSK3 $\beta$  mimicking of WNT signalling [15, 16]. LiCl increased GLP-1 production in entero-endocrine GLUTag cells [17, 18] through a TCF/LEF site in the rat proglucagon (*Gcg*) promoter and WNT was later shown to be an inducer and effector of GLP-1 [19]. Transcriptional control of *Gip* expression is poorly understood [20–23]. We investigated whether WNT signalling controls *Gip* expression, promoting incretin production in general. This is important because although WNT is known to be critical for development and maintenance of gut epithelial cells [24, 25], its role in entero-endocrine differentiation remains obscure. We identified a functional TCF/LEF binding site, which is strongly conserved in mouse, rat and humans, and regulated by WNT/ $\beta$ -catenin and lithium in mouse *Gip* promoter. Mouse proglucagon promoter (*Gcg*) was used as positively regulated control. We show that lithium and WNT favour  $\beta$ -catenin nuclear entry and targeting to

fragments containing the reported TCF/LEF element. Furthermore, lithium positively selected binding of LEF1/ $\beta$  catenin to mouse *Gip* and *Gcg* promoters in entero-endocrine STC-1 cells.

## Methods

**Cell culture** The STC-1 cell line, derived from a mouse intestinal tumour [26], is the only in vitro system known to produce and secrete GIP. Cells cultured in DMEM with 10% vol/vol fetal bovine serum were stimulated with LiCl (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) or recombinant purified WNT3A (Millipore, Billerica, MA, USA). Transient transfections were seeded in 24 well plates at 50% confluence using JetPei PolyPlus reagent (Genycell Biotech, Santa Fe, Granada, Spain), following the manufacturer's instructions. Luciferase reporters were transfected at 125 ng/well and Renilla at 25 ng/well, with expression vectors 200 ng/well. Total ng of DNA transfected per well was made equal to the corresponding empty vectors. Luciferase assays were performed using a kit and dual injectors (Dual Luciferase and Luminometer Glomax 96 respectively; both Promega, Madison, WI, USA).

**Constructs** Mouse *Gip* and *Gcg* promoters were cloned using genomic DNA from STC-1 cells, proof-reading polymerase (Phusion; Finnzymes Oy, Keilaranta, Espoo, Finland) and specific primers (Electronic supplementary material [ESM] Table 1). PCR conditions were: 98°C 30 s; 60°C 30 s; and 72°C 1 min. PCR fragments gel-purified with a kit (Qiagen, Crawley, UK) were cloned into pGL3b (Promega). For sequencing we used a sequence analyser (ABI Prism 3100 Avant; Applied Biosystems, Alcobendas, Madrid, Spain). TESS software [27] was used for in silico sequence analysis. Super8XTOPFlash and Super8XFOP-flash were a gift from R. Moon (HHMI/Pharmacology, University of Washington, Seattle, WA, USA). Super8XTOPFlash contains eight copies of the sequence AGATCAAAGGgggta, including optimal TCF/LEF binding site (uppercase) and a spacer (lowercase). Bases in that sequence (AT) are substituted in the mutant Super8XFOP-flash by GC. Kinase-inactive GSK3 $\beta$  contains a K85R mutation that inactivates ATP binding [28].  $\beta$ -Catenin expression vector was a gift from C. Goding (Ludwig Institute for Cancer Research, Oxford University, UK).

**Western blotting and electrophoretic mobility shift assay** Whole-cell extracts were prepared in RIPA buffer (PBS 1% [vol./vol.], Nonidet 0.5% [wt/vol.], sodium deoxycholate 0.1% [wt/vol.], SDS) and nuclear extracts as described by Andrews and Faller [29]. Antibodies used were: anti total-GSK3 $\alpha/\beta$  (Biosource International, Camarillo,



CA, USA), and anti-phospho-Ser9 (sc-11757) and anti- $\beta$ -catenin (sc-1496-R) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). For electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 1 pmol of Brn2 oligonucleotide bearing the consensus TCF/LEF binding site found in the promoter of transcription factor *Brn-2* (also known as *Pou3f2*) [30] and labelled with HEX (Applied Biosystems) was incubated with 10  $\mu$ g STC-1 extracts. Competitions were with 100 pmol of specified unlabelled oligonucleotides (ESM Table 1). Results were analysed in a Typhoon imaging analyser 9210 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

**Quantitative RT-PCRs** We reverse-transcribed 100 ng/1  $\mu$ g total RNA and amplified it 40 times (94°C 1 min, 60°C 15 s) with Power SYBR Green PCR Mastermix and primers listed in ESM Table 1. 18S rRNA primers were included as non-regulated control gene. Quantitative PCR was performed on cDNA triplicates using a sequence detection system (ABI Prism). Relative expression was calculated using the comparative cycle threshold ( $C_t$ ) method and expressed as  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  [31]. PCR efficiency was ~100%, estimated on standard curves using serial dilutions of cDNA mix and primer pairs for *Gip*, *Gcg* and 18S RNA. Reagents and detection systems were from Applied Biosystems, Alcobendas, Madrid, Spain.

**Chromatin immunoprecipitation** Confluent (60%) STC-1 cells treated with  $\pm 50$  mmol/l LiCl for 24 h were collected and cross-linked (1.1% [vol./vol.] formaldehyde, 30 min at RT). Next,  $2 \times 10^7$  cells/ml were resuspended in 5 mmol/l PIPES pH 8, 85 mmol/l KCl, 0.5% [vol./vol.] NP40, 1 $\times$  COMPLETE protease inhibitor cocktail (Roche, Indianapolis, IN, USA) and sonicated (Bioruptor UCD-200; Diagenode, Liège, Belgium) in 250  $\mu$ l aliquots at high power (30 s sonication, 30 s pause for 12.5 min). Chromatin from  $1 \times 10^6$  to  $2 \times 10^6$  cells was immunoprecipitated overnight with 4  $\mu$ g anti-LEF1(H-70) or anti-TCF4 (N-20; both from Santa Cruz Biotechnology), anti- $\beta$ -catenin or anti-HDAC1 (both from Millipore) or a rabbit pre-immune serum. Antibody complexes were captured on protein A/G-coated magnetic beads (Invitrogen, San Diego). Chromatin was eluted in 1% (wt/vol.) SDS/100 mmol/l NaHCO<sub>3</sub>. DNA was purified using Proteinase K digestion. Equal amounts of purified DNA (measured A<sub>260</sub> in nanodrop) from each immunoprecipitate were amplified (semi-quantitative 20–30 cycles or quantitative PCR) to calculate enrichment. Primer efficiency was ~100% (determined with standard curves using dilutions of input chromatin). Five biological replicates were analysed. Mean $\pm$ SEM of values obtained in samples treated with lithium were divided by values obtained in control untreated samples to obtain the ratio +lithium:–lithium that is presented.

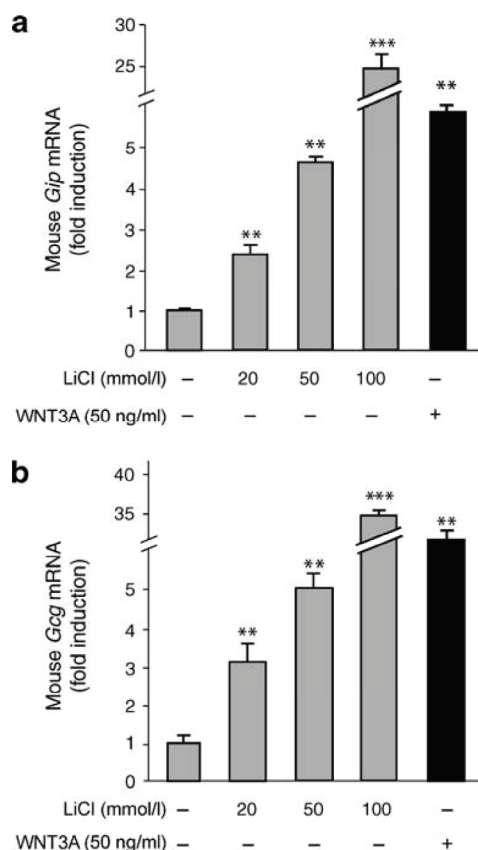
**Statistical analysis** Results are presented as fold induction, mean $\pm$ SEM, from three biological replicas for luciferase assays, western blots and RT-PCR, or from five biological replicas for chromatin immunoprecipitation (ChIP).

Tests for significance between two sample groups were performed with Student's *t* test. For multiple comparisons, ANOVA was used with Bonferroni's post test. Differences were considered statistically significant if  $p < 0.05$ .

## Results

**WNT and lithium induce mouse *Gip* gene expression in entero-endocrine cells** LiCl or recombinant purified WNT3A proteins were added to alternate plates of STC-1 cells 24 h before collection. Purified mRNA was analysed by quantitative RT-PCR using specific primers for *mouse Gip* and *Gcg*, the later served as positive control [17]. Figure 1 shows that both *mouse Gip* and *Gcg* mRNAs increased approximately two- to threefold, fivefold and 25-fold with 20, 50 and 100 mmol/l LiCl respectively. We concluded that LiCl induces *mouse Gip* and *Gcg* expression in STC-1 entero-endocrine cells in a dose-dependent manner. Purified WNT3A induced *mouse Gip* and *Gcg* mRNA by six- and tenfold respectively. RT-PCR analysis of WNT receptors using primer pairs listed in ESM Table 2 revealed the presence of receptors frizzled 1 and low-density lipoprotein receptor-related proteins 5/6 (LRP-5/6) in entero-endocrine STC-1 cells, which are known to signal through the canonical WNT pathway (ESM Fig. 1). Lithium and WNT signalling inhibit GSK3 $\beta$  through accumulation of inactive phospho-Ser21/Ser9 GSK3 $\alpha/\beta$  [32]. Lithium also inhibits GSK3 $\beta$  competing with Mg<sup>2+</sup> [33] and additionally has a wide range of targets, reviewed in [34–36]. Therefore, we sought to confirm that endogenous *mouse Gip* and *Gcg* induction in STC-1 cells was mediated by mimicking canonical WNT/ $\beta$ -catenin pathway via GSK3 $\beta$  inhibition and not through alternative pathways (see below).

**Lithium treatment mimics WNT signalling controlling bipartite  $\beta$ -catenin-TCF/LEF trans-activating factors in entero-endocrine STC-1 cells** To determine whether entero-endocrine STC-1 cells were endowed with TCF/LEF factors controlled by WNT/ $\beta$ -catenin, TOPFlash/FOPFlash luciferase reporters were transfected to specifically measure  $\beta$ -catenin/TCF-regulated transcriptional function [37, 38]. WNT and lithium increased TOP:FOP activity ratio in STC-1 cells, suggesting that endogenous bipartite  $\beta$ -catenin–TCF/LEF factors formed as a result of GSK3 $\beta$  inhibition and  $\beta$ -catenin accumulation. Figure 2 shows that LiCl or WNT3A increased TOPFLASH but not FOPFLASH activity by



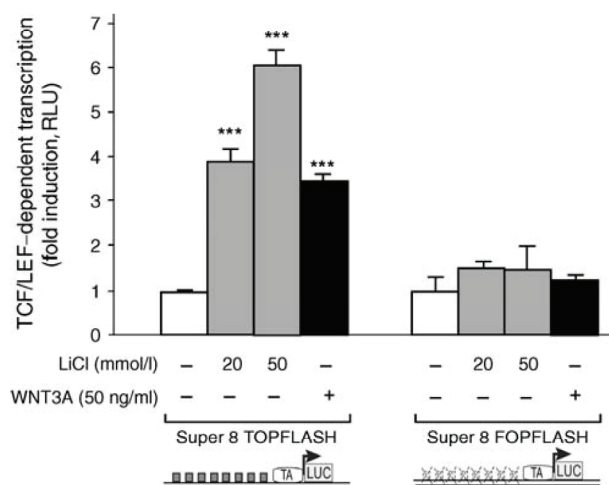
**Fig. 1** Lithium and WNT induce *Gip* gene expression in entero-endocrine STC-1 cells. For quantitative RT-PCR, mRNAs extracted from STC-1 cells cultured for 24 h with 20 to 100 mmol/l LiCl or recombinant WNT3A (50 ng/ml) were reverse transcribed. cDNAs were subjected to quantitative real-time PCR in the presence of fluorescent-labelled probes and primers specific for *Gip* (a) or *Gcg* (*GLP-1*) (b) as a positive control. Values were normalised with the endogenous control (18S) and referred as fold induction over the untreated control cells. Values represent mean $\pm$ SEM;  $n=4$ . \*\* $p<0.01$  and \*\*\* $p<0.001$  by ANOVA

four- to sixfold. Thus, lithium mimics WNT signalling, thereby enhancing  $\beta$ -catenin–TCF/LEF transcriptional activity in entero-endocrine STC-1 cells.

**Lithium and WNT induce mouse *Gip* and *Gcg* promoter activities, a process reproduced by GSK3 $\beta$  inactivation** The existence of *cis*-regulatory sequences in the mouse *Gip* gene which respond to WNT/ $\beta$ -catenin signalling like the TOPFlash construct was explored by cloning mouse *Gip* 5'-flanking regulatory regions upstream of the luciferase coding sequence. This reporter included 925 bp of the promoter and 831 bp downstream containing the 5' untranslated region and first intron. This construct or the empty reporter was transfected into STC-1 entero-endocrine cells; LiCl or WNT3A were added 24 h before collection for luciferase assays. Since the rat promoter directing the

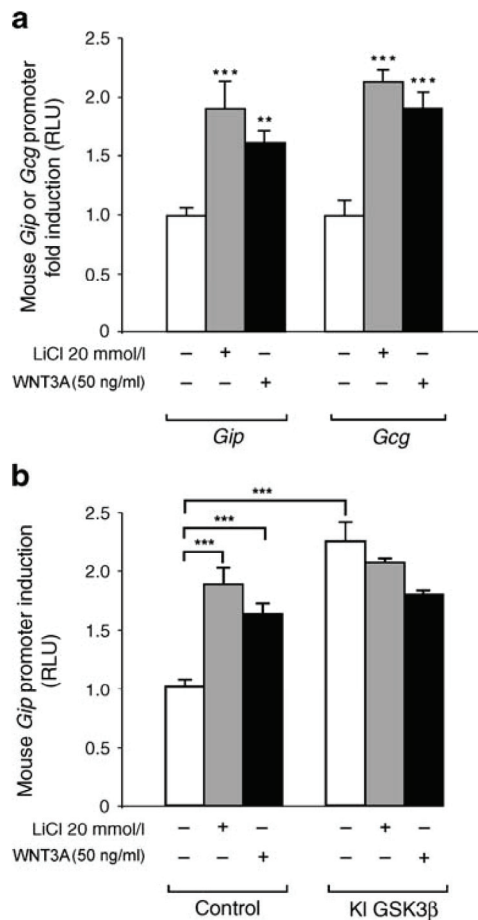
synthesis of GLP-1 (*Gcg*) is regulated by lithium/WNT through an element conserved in mouse [17], we cloned the mouse *Gcg* promoter which directs synthesis of GLP-1 and used it as positive control. Figure 3a shows that both lithium and WNT3A induced mouse *Gip* and *Gcg* promoter activities by about twofold. These results suggest that mouse *Gip* and *Gcg* promoters contain equivalent *cis*-element(s) regulated by lithium/WNT. If mouse *Gip* promoter induction was exerted through inhibition of GSK3 $\beta$ , overexpression of a kinase inactive version of GSK3 $\beta$  (kinase-inactive GSK3 $\beta$ ) [28] should mimic lithium/WNT3A induction. In an environment loaded with excess of kinase-inactive GSK3 $\beta$ , lithium should become unable to further induce mouse *Gip* promoter activity. Figure 3b shows that kinase-inactive GSK3 $\beta$  induced approximately twofold mouse *Gip* promoter activity; neither lithium nor WNT3A further increased this induction. We concluded that mouse *Gip* promoter contains *cis*-regulatory sequences controlled by lithium and WNT through GSK3 $\beta$  inactivation.

**WNT and lithium increase soluble  $\beta$ -catenin and  $\beta$ -catenin induces *Gip* promoter activity in entero-endocrine cells** WNT/lithium-dependent GSK3 $\beta$  inactivation should increase soluble  $\beta$ -catenin and transcriptional activity of bipartite  $\beta$ -catenin–TCF/LEF factors on mouse *Gip* promoter. Figure 4a shows that LiCl and WNT significantly increased nuclear  $\beta$ -catenin (two- to threefold) in STC-1 cells, with quantification of three experiments and repre-



**Fig. 2** Lithium activates WNT effectors such as  $\beta$ -catenin–TCF/LEF trans-acting factors, in entero-endocrine STC-1 cells. STC-1 cells transfected with TOPFLASH containing eight copies of the consensus TCF/LEF binding site (grey squares, x-axis label) or FOPFLASH (mutated version) were cultured for 24 h with the indicated LiCl or WNT3A concentration before collection for luciferase assays. Relative luciferase units (RLU) were calculated as fold induction relative to the corresponding control (mean $\pm$ SEM,  $n=3$ ). \*\*\* $p<0.0001$  by one-way ANOVA. No significant differences were found in the FOPFLASH-transfected cells.



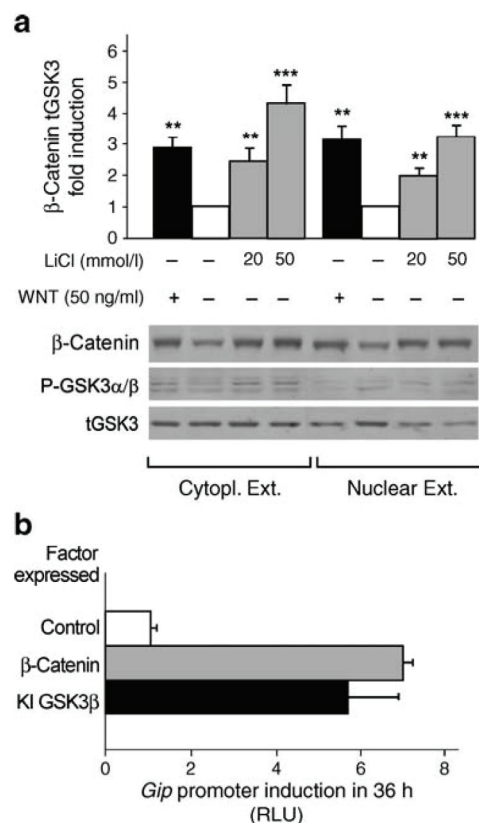


**Fig. 3** Lithium and WNT induce mouse *Gip* and *Gcg* promoter activities at the same level, a process reproduced by GSK3β inactivation. **a** Lithium and WNT3A induced an approximately twofold increase of mouse *Gip* and *Gcg* promoter activity in entero-endocrine STC-1 cells. Mouse *Gip* reporter included 925 bp of the mouse *Gip* promoter and 831 bp containing the first intron. Mouse *Gcg* construct contained 1921 bp of the proglucagon promoter. **b** Overexpression of kinase inactive GSK3β (KI GSK3β) induced an approximately twofold increase of mouse *Gip* promoter activity in 24 h in the absence of lithium. GSK3β inhibition may mediate the effects of WNT and lithium on mouse *Gip* promoter because neither WNT3A nor lithium could increase induction when KI GSK3β was overproduced. Relative luciferase units (RLU) were calculated as fold induction relative to a corresponding control (mean±SEM,  $n=3$ ). \*\* $p<0.01$  and \*\*\* $p<0.001$  by Student's  $t$  test

sentative western blots also showing lithium/WNT-dependent inactivation of GSK3β (Phospho-Ser 9) and accumulation of cytoplasmic β-catenin. Thus, lithium and WNT inactivated GSK3β in STC-1 cells allowing β-catenin nuclear entry. Figure 4b shows that β-catenin accumulation mediated mouse *Gip* promoter activity increases in STC-1 cells in co-transfection experiments with the mouse *Gip* reporter and a vector to overexpress β-catenin. The positive control, kinase-inactive GSK3β and β-catenin, increased mouse *Gip* promoter activity some fivefold in 36 h. Thus,

lithium and WNT jointly achieve GSK3β inhibition and accumulation of soluble β-catenin targeting *cis*-regulatory elements at the mouse *Gip* promoter in entero-endocrine STC-1 cells.

Mouse *Gip* promoter contains functional TCF/LEF binding elements conserved in rat and humans *cis*-Regulatory elements targeted by WNT/lithium effectors and responsible for *Gip* induction remained unidentified. In silico analysis revealed nine putative TCF/LEF binding sites in the mouse *Gip* regulatory sequences shown schematically in Fig. 5a. The ability of putative TCF/LEF binding sites to



**Fig. 4** Lithium and WNT increase soluble β-catenin, and β-catenin induces mouse *Gip* promoter activity in entero-endocrine cells. **a** Western blot analysis of cytoplasmic (Cytopl.) or nuclear (NE) extracts (Ext.) from STC-1 cells cultured for 24 h with LiCl or recombinant WNT3A at the indicated concentrations, with blot showing β-catenin, inactive P-Ser9/21 GSK3α/β P-GSK3α/β and total GSK3α/β (tGSK3) as loading control, and bar graph with quantification of β-catenin induction data from three independent experiments; results are mean±SEM and expressed as fold induction over the control untreated cells. \*\* $p<0.01$  and \*\*\* $p<0.0001$  according to one-way ANOVA. **b** Luciferase assays on STC-1 cells co-transfected with the mouse *Gip* promoter reporter as described in Fig. 3b revealed that β-catenin overexpression induced mouse *Gip* promoter activity as strongly as kinase inactive (KI) GSK3β (~sixfold in 36 h). Relative luciferase activities were calculated as fold induction relative to a corresponding control (mean±SEM,  $n\geq 3$ ). RLU, relative luciferase units

bind endogenous STC-1 factors was assayed by gel retardation (EMSA) (Fig. 5b). Oligonucleotides spanning theoretical mouse *Gip* TCF/LEF binding sites competed with a labelled probe bearing a consensus TCF/LEF binding site for binding of STC-1 extracts. Recombinant purified glutathione *S*-transferase (GST)-tagged LEF (Recomb) or Jurkat extracts served as positive retarding controls. TCF/LEF binding sites 1 and 2 (in the first intron), and 5 (in the proximal promoter) efficiently competed with binding of endogenous TCF/LEF factors to the consensus probe, whereas TCF/LEF binding sites 6, 7 and 8, or an unrelated oligonucleotide did not compete (oligonucleotide sequences, see ESM Table 1). Thus, at least three TCF/LEF binding sites were able to bind endogenous STC-1 factors in vitro. Systematic deletions of the 5'-flanking region were challenged for  $\beta$ -catenin-mediated activation in co-transfections. Luciferase assays were used to test their functionality (Fig. 5c, d). Both full-length and a promoter-only construct (TCF/LEF binding sites 5–9) mediated a similar seven- to tenfold induction by  $\beta$ -catenin. Thus, deletion of intronic sites TCF/LEF binding sites 1 to 4 hardly affected  $\beta$ -catenin-mediated induction despite the strong affinity shown by the first two of these in vitro (see EMSA above). These results suggest that the main *cis*-element for  $\beta$ -catenin induction was contained in the promoter. Deletion of TCF/LEF binding sites 7 to 9 in the promoter did not affect  $\beta$ -catenin-dependent mouse *Gip* promoter induction, validating the low affinity of these sites for endogenous TCF/LEF factors as observed in EMSA. Western blotting (Fig. 5e) showed similar  $\beta$ -catenin levels in transfected cells. Thus, TCF/LEF binding sites 5 and/or 6 mediated WNT/ $\beta$ -catenin induction of mouse *Gip* promoter. The lack of affinity shown in EMSA by the oligonucleotide containing TCF/LEF binding site 6 for endogenous TCF/LEF factors strongly suggests that binding site 5 was the functional site mediating  $\beta$ -catenin induction. To prove its functionality, we deleted either TCF/LEF binding site 6 or 5, and challenged for  $\beta$ -catenin induction (Fig. 5f, g).  $\beta$ -Catenin induction through the fragment containing only TCF/LEF binding sites 5/6 reproduced induction obtained with the full-length construct. Deletion of TCF/LEF binding site 6 did not affect, while deletion of site 5 abolished  $\beta$ -catenin induction. We concluded that the former in the proximal promoter is the *cis*-element functionally responsible for  $\beta$ -catenin induction of the mouse *Gip* promoter. Western blotting (Fig. 5e, h) showed similar  $\beta$ -catenin levels in transfected cells. Note that  $\beta$ -catenin-dependent *Gip* induction varied from around fivefold in 36 h (Fig. 5g) up to about tenfold in 48 h (Fig. 5d).

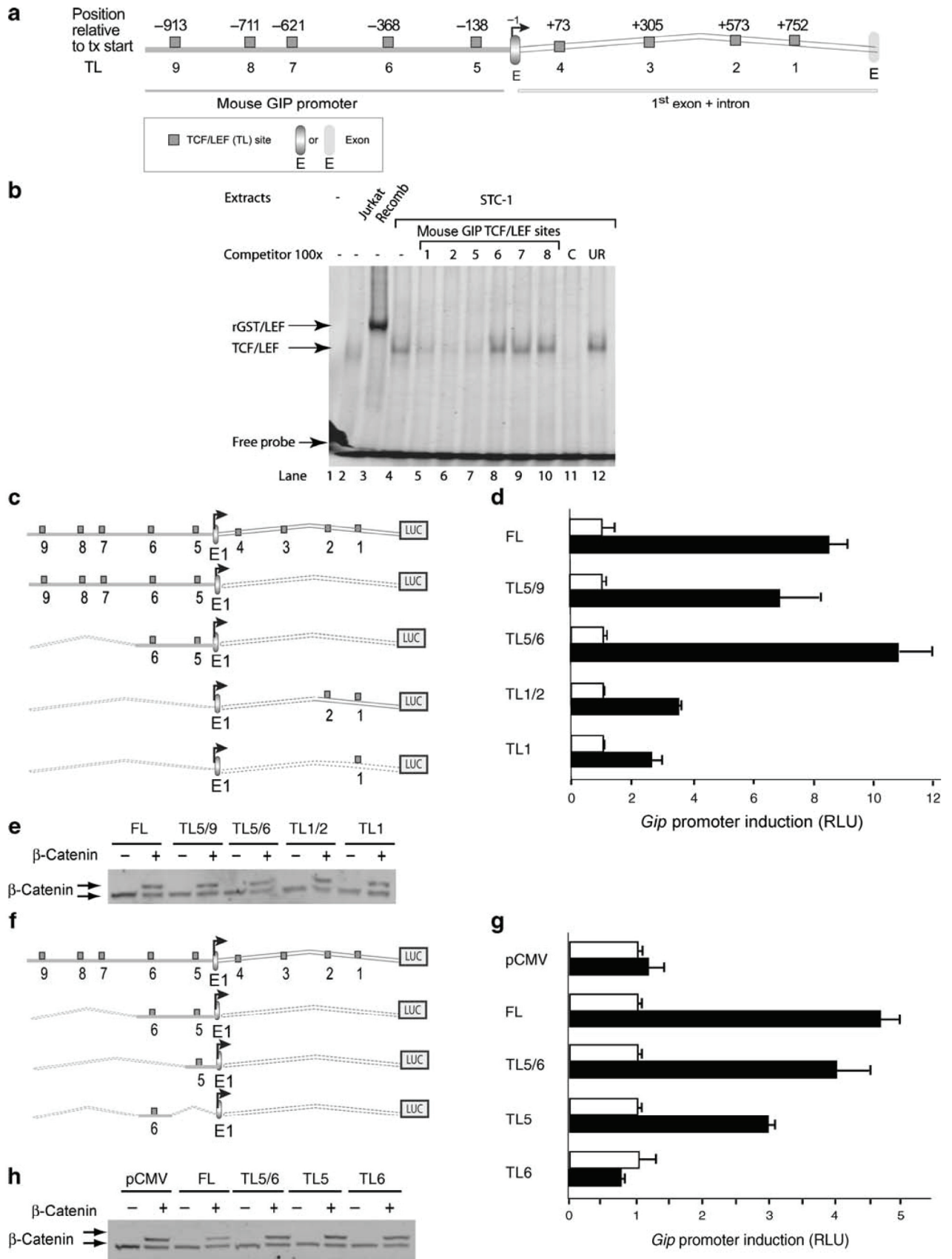
The importance of TCF/LEF binding site 5 is supported by a high degree of conservation between human, rat and mouse promoter sequences (see alignment in Fig. 6a). Furthermore, oligonucleotides containing human and rat promoter TCF/LEF binding sites strongly competed in

EMSA with the consensus probe (data not shown), suggesting that WNT/ $\beta$ -catenin regulation of GIP production occurs in mouse, rats and humans.

**TCF4 and LEF1 bind to TCF/LEF binding site 5 in mouse *Gip* promoter and exchange co-factors in response to lithium** In vivo binding of TCF/LEF factors to the TCF/LEF binding site 5 (TL5)-containing region of mouse *Gip* promoter was examined by ChIP using STC-1 cells treated with or without lithium for 24 h. Figure 6b shows a scheme of mouse *Gip* gene indicating positions of primer pairs used. Experimental primers amplified a 302 bp fragment spanning TCF/LEF binding site 5 (positions –273/+25 in mouse *Gip* promoter). Negative control primers amplified a TCF/LEF binding site-free region of 300 bp within mouse *Gip* intron 2. Positive control primers spanning the TCF/LEF binding site reported at the promoter for *Gcg* (position –170) were also used. Primer pairs rendered the expected product when input chromatin was used as template (Fig. 6c). Lithium induced changes in the binding of LEF1, TCF4,  $\beta$ -catenin or HDAC1 to TCF/LEF binding site 5 were evaluated by semi-quantitative PCR on immunoprecipitated chromatin. Representative gels

**Fig. 5** Mouse *Gip* promoter contains functional TCF/LEF binding elements. **a** Nine theoretical TCF/LEF binding sites (grey squares) were found in mouse *Gip* promoter and 5'-flanking untranslated region. E, exon. **b** EMSA using a fluorescently labelled probe containing the consensus TCF/LEF element present in the *Brn2* (also known as *Pou3f2*) promoter. Lane 1: free probe. Lanes 2 and 3 were positive binding controls using Jurkat extracts and recombinant (Recomb) glutathione *S*-transferase-tagged LEF respectively. Lane 4: binding of endogenous TCF/LEF factors in STC-1 extracts. Lanes 5–10: binding of STC-1 factors to the consensus was competed for with 100× excess of oligonucleotide probes containing the indicated TCF/LEF binding sites numbered as above (**a**). Lane 11: positive competition control (C) where binding to the labelled BRN2 oligonucleotide was competed for with 100× excess of the same unlabelled oligonucleotide. Lane 12: negative competition control, where binding was competed for with 100× excess of an unrelated (UR) oligonucleotide. Positions of the retarded complexes of endogenous TCF/LEF or recombinant (rGST/LEF) are indicated on the left. Mouse *Gip* TCF/LEF binding sites 1, 2 and 5 strongly competed for binding to the consensus (lanes 5–7), while sites 6 to 8 did not show affinity for endogenous STC-1 factors (lanes 8–10). **c–h** Luciferase assays to test the functionality of TCF/LEF sites.  $\beta$ -Catenin-dependent induction of the full length (FL) 5'-flanking region of mouse *Gip* gene cloned (from position –925 to +831) was compared with that of deletions. **c** Scheme of constructs transfected. Grey squares denote TCF/LEF site numbers as above (**a**). **e, h** The related western blots indicate that exogenous  $\beta$ -catenin levels (upper bands) were similar in all transfections and endogenous  $\beta$ -catenin levels (lower bands) were also similar. **d** TCF/LEF binding sites at the promoter are responsible for most of  $\beta$ -catenin-dependent induction. **g** TCF/LEF binding site 5 (TL5) alone, but not TL6 is capable of mediating  $\beta$ -catenin induction. Lack of  $\beta$ -catenin induction in cells co-transfected with an empty vector (pCMV) demonstrates that  $\beta$ -catenin induction occurred through specific mouse *Gip* promoter sequences. White bars, control; black bars,  $\beta$ -catenin 48 h (**d**),  $\beta$ -catenin 36 h (**g**). RLU, relative luciferase units





**a**

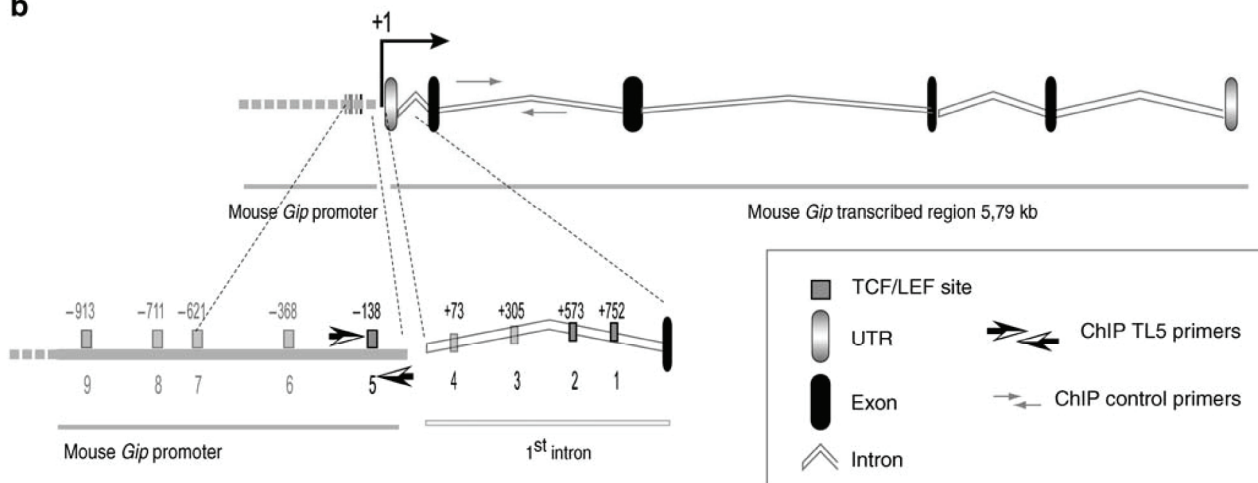
Gip promoter TL5 site

*Mus musculus*:NT\_165773.2. Pos. [-138/-130] ATACCCAAATGTTAATCACCCATTAGCACAGCCAGGAGCAAAGGGGAAAGTGATTAGGT  
*Rattus norvegicus*:gb|AC120322.5.Pos. [-138/-130] ATACCCAAATGTTAATCACCCATTAGCACAGGCCAGGAGCAAAGGGGAAAGTGATTAGGT  
*Homo sapiens*:NW\_001838448.1.Pos. [-141/-133] ATAGCCAAATGTTAATCACCAATTAGCACAGTTCAGGAGCAAAGGGCAACTCTATTATGT

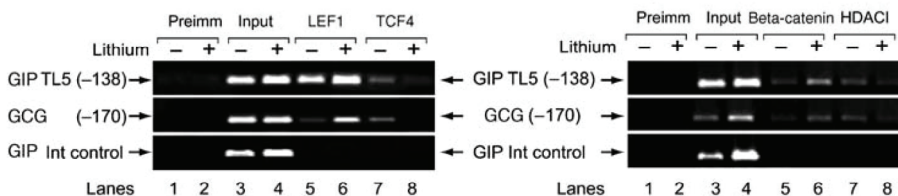
Gcg promoter TL site

*Mus musculus*:NW\_001030694.1 Pos. [-170/-162] TCCAAACTGCCCTTCCATTCCCAAACAGAAA-----GGCACAAGAGTAAATAAATGTTTCGGG  
*Rattus norvegicus*:NW\_047655.1. Pos. [-220/-212] TCCAAACTACCTTCCATTCCCAAACAGAAA-----GGCACAAGAGTAAATAAAGTTTCGGG  
*Homo sapiens*:NW\_001838448.1. Pos. [-189/-181] TCCAAGCTGCTCTCCATTCCCAACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGATACAAGAGTGCATAAAGTTTCAGG

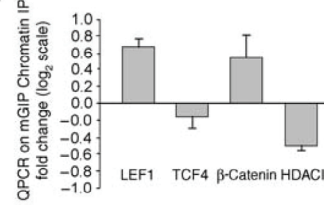
**b**



**c**



**d**



(Fig. 6c) show specific PCR fragments for mouse *Gip* and *Gcg* promoter sites. Pre-immune rabbit serum did not immunoprecipitate chromatin to render PCR fragments confirming the specificity of antibodies. Both LEF1 and TCF4 bound chromatin spanning mouse *Gip* TCF/LEF binding site 5 (positions -138/-130) and the previously reported site at the *Gcg* promoter (positions -170/-162) in the absence of lithium (Fig. 6c). Strikingly, addition of lithium diminished chromatin immunoprecipitated through TCF4 and increased LEF1-immunoprecipitated chromatin in both mouse *Gip* and *Gcg* promoter sites (Fig. 6c). This

result suggests that LEF1 binding to these sites was favoured at the expense of TCF4. Thus, environmental signals such as lithium regulate binding specificity of particular TCF/LEF factors to their target sites. Anti-LEF1 or anti-TCF4 did not immunoprecipitate the TCF/LEF-free mouse *Gip* and *Gcg* promoter sites (Fig. 6c), demonstrating that binding to the mouse *Gip* and *Gcg* promoter sites was specific. Selection of which factor (LEF1 or TCF4) is bound to these closely related promoters (mouse *Gip* and *Gcg*) was just one chromatin remodelling output promoted by lithium, which additionally selected the co-factors ( $\beta$ -catenin or

**Fig. 6** TCF/LEF sites are conserved in mouse *Gip* and *Gcg* proximal promoters. TCF4/LEF1 bind in vivo to TCF/LEF binding site 5 in the mouse *Gip* promoter and exchange co-factors in response to lithium. **a** Alignment of sequences spanning TCF/LEF binding site 5 (TL5) in mouse, rat and human *GIP* and in proglucagon (which direct synthesis of GLP-1) promoters, spanning the previously reported TCF/LEF site. Accession numbers of sequences used are indicated. The position of the sites referred to transcription initiation are also included: [−138/−130] for mouse *Gip* and [−170/−162] for mouse *Gcg*. **b** Scheme of mouse *Gip* gene depicting the promoter and 5'-flanking sequences with putative TCF/LEF binding sites and positions occupied, intron/exon structure and 3' untranslated region. Sequence is based on GenBank accession number NC\_000077.5. **c** Semiquantitative PCR on chromatin immunoprecipitated with each antibody showing that lithium increases affinity of the indicated TCF/LEF binding sites in mouse *Gip* and *Gcg* promoters for LEF1 and  $\beta$ -catenin as indicated. *GIP* TL5 (−138), mouse site at position [−138/−130]; *GCG* (−170), mouse site in the *Gcg* promoter at position [−170/−162] as depicted in panel (a). Lanes 1 to 2, control for the specificity of the antibodies: preimmune (preimm) serum. Lanes 3 to 4, input chromatin used as template renders the expected fragment with all three primer pairs. Lanes 5 to 6 (LEF1): lithium increased LEF1 immunoprecipitated chromatin fragments from mouse *Gip* and *Gcg* promoters spanning the indicated sites. Lanes 7 to 8 (TCF4): lithium decreased chromatin immunoprecipitated through TCF4 at the corresponding sites. The bottom gel shows that neither LEF1 nor TCF4 antibodies could immunoprecipitate chromatin containing the TCF/LEF free region at the intron. Specific ChIP was increased by lithium through  $\beta$ -catenin (lanes 5, 6) and decreased through HDAC1 (lanes 7, 8). **d** Quantitative PCR performed on five biological replicates. Normalised values obtained with lithium divided by values obtained without lithium are presented as mean $\pm$ SEM on a  $\log_2$  scale. Values for LEF1 and  $\beta$ -catenin are positive, indicating that lithium favours immunoprecipitation through these factors. Negative values for TCF4 and HDAC1 indicate that ChIP through these factors is disfavoured by lithium

HDAC) recruited to the promoter (Fig. 6c). As expected, lithium treatment favoured  $\beta$ -catenin binding to both promoters, displacing the co-repressor HDAC1 (Fig. 6c). Anti- $\beta$ -catenin (or anti-HDAC1) immunoprecipitation of either input chromatin or chromatin previously immunoprecipitated by anti-LEF1 or anti TCF4 antibodies (data not shown) led us to the same conclusion. PCR fragments were gel purified and confirmed by sequencing to span mouse *Gip* TCF/LEF binding site 5 (position −138) and *Gcg* TCF/LEF binding site (−170). Thus, lithium remodels transcriptional complexes built upon the mouse *Gip* or *Gcg* promoters at least in two different aspects: (1) choice of the TCF/LEF factor; and (2) choice of co-factors bound. To confirm our results on mouse *Gip* promoter, quantitative PCR was performed in five biological replicates (Fig. 6d). The magnitude and direction of lithium-induced changes were calculated as the ratios +Li:−Li, i.e. values obtained in the presence of lithium divided by values obtained in its absence. A ratio +Li:−Li=1 means no influence of lithium, while +Li:−Li>1 or <1 means that lithium respectively favours or disfavours ChIP through the specified factor. Results (Fig. 6d) are presented as mean $\pm$ SEM on a  $\log_2$  scale because it is more intuitive: the ratio +Li:−Li=1 is transformed to value=0, where the x axis is located ( $\log_2$

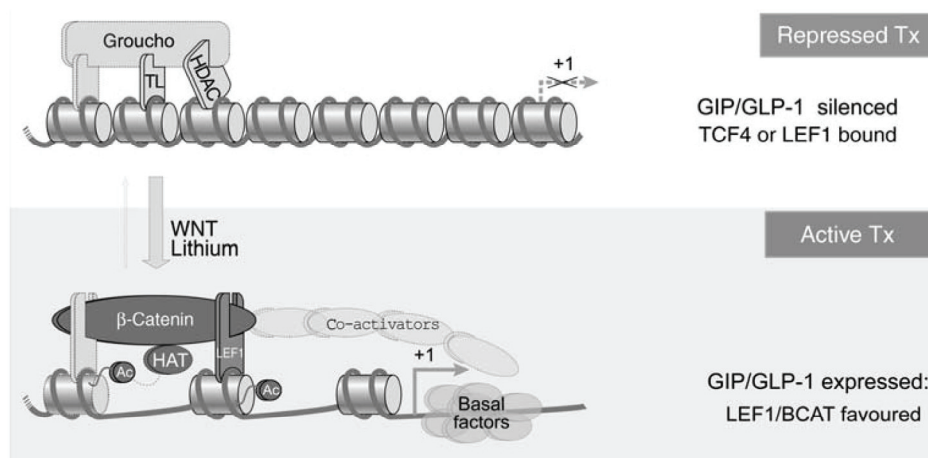
(1)=0). Values +Li:−Li>1 obtained when lithium favoured binding/immunoprecipitation appear in the positive side of the graph. Conversely +Li:−Li<1 values obtained when lithium disfavoured binding/immunoprecipitation appear in the negative side. In agreement with semiquantitative PCRs, quantitative PCR results show that LEF1 and  $\beta$ -catenin binding were favoured in the presence of lithium while immunoprecipitation through TCF4 and HDAC1 was diminished by lithium. These results suggest that lithium promotes replacement of TCF4/co-repressor complexes by LEF1/ $\beta$ -catenin-activating complexes at mouse *Gip* TCF/LEF binding site 5. Recombinant WNT3A also increased binding of both LEF1 and  $\beta$ -catenin to this region of the mouse *Gip* promoter (ESM Fig. 2)

The model in Fig. 7 summarises our understanding of the changes induced by WNT or lithium on mouse *Gip* and *Gcg* promoters:  $\beta$ -catenin entry into the nucleus (alone or in complex with LEF1) would result in TCF4/de-acetylases (HDAC1) exclusion, favouring LEF1/ $\beta$ -catenin binding to the site. Local nucleosomes may then be acetylated by histone acetylases brought by  $\beta$ -catenin, allowing chromatin opening to the basal transcription machinery.

## Discussion

We asked whether WNT signalling induces *Gip* gene expression and promotes incretin production by entero-endocrine cells. This question entails another, as yet unclear aspect of WNT signalling, i.e. whether it plays a role in differentiated entero-endocrine cells, given that GIP and GLP-1 may be considered differentiation markers for K and L intestinal cells respectively. We found that WNT/ $\beta$ -catenin or lithium induced expression of *Gip* and *Gcg* (to produce GIP and GLP-1 respectively) to the same levels in entero-endocrine STC-1 cells. STC-1 cells are the best in vitro system for evaluating GIP production. Jin and co-workers showed lithium-induced GLP-1 synthesis in GLUTag cell lines using a chimera-containing rat G2 enhancer fused to thymidine kinase minimal promoter to direct luciferase synthesis. A TCF/LEF binding site identified was shown by ChIP to bind TCF4 and  $\beta$ -catenin [17, 18]. We obtained essentially the same results in STC-1 cells using strictly mouse promoter sequences (*Gcg*) fused to luciferase. Our results reinforce those of Ni et al. [17] and generalise WNT/ $\beta$ -catenin-dependent induction to both incretins: GIP and GLP-1. Our *Gcg* construct bore the mouse promoter (not rat) and lacked the thymidine kinase minimal promoter sequence (which may mask transcriptional effects), and yet we obtained inductions for *Gcg* similar to those obtained by Jin and co-workers [17, 18] in an alternative cell context (STC-1 cells). Beyond that, we





**Fig. 7** Lithium or WNT/ $\beta$ -catenin remodel the transcriptional complexes built upon them. Model of incretin production control by WNT signalling and lithium. In the absence of lithium or WNT signalling, TCF/LEF factors, bound at  $-170$  and  $-138$  in mouse *Gcg* and *Gip* promoters respectively would keep the co-repressors Groucho and HDAC1 bound, maintaining interactions between local nucleosomes. Consequently chromatin would be compacted and the genes silenced. In the presence of lithium or WNT signals soluble  $\beta$ -catenin increases

and enters the nucleus (probably in a complex with LEF1). The complex  $\beta$ -catenin/LEF1 displaces TCF4-co-repressors including histone deacetylases (HDACs) from the site and brings in co-activators (such as histone acetyl transferases [HAT]), which allow chromatin opening and recruitment of the transcription machinery. TL, TCF/LEF binding site; Tx, transcription; Ac, Acetylated histone tails; BCAT,  $\beta$ -catenin

show a replacement of TCF4 by LEF1 and of co-repressor HDAC1 by co-activator  $\beta$ -catenin at a position close to the transcription initiation site in the mouse *Gip* promoter. Uninduced mouse *Gip* and *Gcg* promoters bind both TCF4 and LEF1, but intriguingly lithium and WNT impose a preference for LEF1 in STC-1 cells. LEF1 is less abundant than TCF4 in entero-endocrine cells according to our own unpublished quantitative RT-PCR results (A. Chocarro-Calvo, J.M. García-Martínez and C. García-Jiménez). Consequently, LEF1 selection must be based on common (architectural) changes boosted by lithium at these promoters. Lithium-induced  $\beta$ -catenin accumulation may promote  $\beta$ -catenin–LEF1 association in the cytoplasm, facilitating nuclear entry of the complex in entero-endocrine cells as previously shown in other cells [39]. Nuclear  $\beta$ -catenin–LEF1 complexes would replace pre-existing TCF4-co-repressor complexes in these promoters. Additional  $\beta$ -catenin–LEF1 interactions may facilitate the selectivity and deserve further exploration. TCF4 and LEF1 bind the same DNA element and their relative affinity for  $\beta$ -catenin has not been compared in entero-endocrine cells treated with lithium. It seems easier, however, to bind pre-existing LEF1– $\beta$ -catenin complexes, displacing TCF4-co-repressors from the site, than to dissociate LEF1 from  $\beta$ -catenin and TCF4 from co-repressors, re-associate TCF4 and export or sequester LEF1. Understanding the mechanisms behind TCF/LEF factors selectivity at promoters is one of the major challenges in the field and we are currently working to test this model.

Mechanistically, our results indicate that lithium induces incretins (GIP and GLP-1) synthesis in mouse STC-1 cells, increasing binding of the WNT effector  $\beta$ -catenin/LEF1 to these promoters. A high degree of interspecies TCF/LEF binding site sequence conservation in both mouse *Gip* and *Gcg* promoters (Fig. 6a) highlights architectural similarities and their importance.

Synthesis of incretins, as insulin inducers, plays a role in diabetes. *Tcf7l2* variants are associated with increased type 2 diabetes risk and impaired incretin-induced insulin secretion [40], and have linked WNT with type 2 diabetes [41]. GLP-1, as inducer and effector of WNT signalling [19], links WNT, an incretin and diabetes. We show here that WNT induces incretin synthesis in general (GLP-1 and GIP). Altered GIP synthesis and signalling are linked to type 2 diabetes mainly through obesity (an engine of the diabetes epidemic) and hyperinsulinaemia. The observations detailed in the next paragraph suggest that ‘hyper-GIPaemia’, followed by beta cell desensitising to GIP, may lie at the onset of diabetes (see below). Consequently, preventive strategies focussed on GIP should be investigated. This may complement the current therapeutic improvement offered by GLP-1 analogues. Observations linking altered GIP synthesis/signalling to obesity and diabetes come from mouse/rat models and human patients. In mouse models, GIP receptor knockout animals are resistant to diet-induced obesity and its associated risk of diabetes [9, 10, 42]. In rat models, Zucker obese rats show increased number of GIP-

producing cells and augmented incretin-induced insulin secretion at basal glucose levels [43]. JCR:LA-cp rats, a model of hyperinsulinaemia and obesity, show more severe ‘hyperGIPaemia’ and hyperinsulinaemia than Zucker rats [44]. And in streptozotocin-induced diabetic rats, enhanced *Gip* gene expression and elevated serum levels induced chronic desensitisation of GIP receptor in vivo [2]. Finally, human diabetic and/or obese patients have increased plasma GIP levels after an oral load of glucose [45] and increased fasting responses to GIP [46, 47]. Moreover, insulinotropic effects of GIP are lost in type 2 diabetes patients and their first-degree relatives [48, 49], while GLP-1 response is conserved. This suggests a progressive failure in communication between the entero-insular axis that includes altered GIP synthesis and function at the onset of type 2 diabetes while keeping the response to GLP-1. Our results suggest that altered WNT signalling may lie at the onset of type 2 diabetes and *Tcf7l2* variants associated with diabetes may be responsible for increased LEF1 levels and incretin production, a topic that deserves further research and may lead to preventive strategies.

Finally, we would like to speculate that metabolic disorders (weight gain, obesity and type 2 diabetes) frequently found in patients chronically treated with lithium as a mood stabiliser [50] may be partially mediated by increased or untimely GIP production. GIP serum levels and responses in these patients may indicate whether modification of GIP signalling amounts to a new window of opportunity for treatment.

Thus, WNT/ $\beta$ -catenin and lithium induce GIP production in mouse entero-endocrine STC-1 cells, suggesting a general role of WNT signalling and its effector, the bipartite transcription factor  $\beta$ -catenin–TCF/LEF, in the control of incretin production, and a novel link between WNT, incretins and diabetes.

**Acknowledgements** This work was financed by grant URJC-CM-BIO-0522 and by Fundación Mutua Madrileña (FMM). A. Chocarro-Calvo was supported by FMM. C. M. Moya was supported by the Juan de la Cierva Programme, Spanish Ministry of Science and Innovation, and by SAF 07/60164. J. M. García-Martínez and C. García-Jiménez are teachers at the Universidad Rey Juan Carlos (URJC), Madrid. We thank D. Hanahan (UCSF, Diabetes Center, San Francisco, CA, USA) for providing the STC-1 cells and B. Yusta (Banting and Best Diabetes Centre, Toronto, ON, Canada), P. Varga-Weisz (Babraham Institute, Cambridge, UK), M. Ros, T. Fernández-Agulló, M. García (all URJC, Madrid), P. Santisteban (IIB-CSIC, Madrid) and G. Bedó (Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay) for careful reading and discussions. We also thank J. Pérez (IIB-CSIC, Madrid) for help with the figures. Excellent technical support was provided by J. A. Mas (CAT-URJC, Madrid) and I. Velasco at our lab.

**Duality of interest** The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

## References

- Gault VA, Irwin N, Harriott P, Flatt PR, O'Harte FP (2003) DPP IV resistance and insulin releasing activity of a novel di-substituted analogue of glucose-dependent insulinotropic polypeptide, (Ser2-Asp13)GIP. *Cell Biol Int* 27:41–46
- Tseng CC, Boylan MO, Jarboe LA, Usdin TB, Wolfe MM (1996) Chronic desensitization of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor in diabetic rats. *Am J Physiol* 270:E661–E666
- Beck B (1989) Gastric inhibitory polypeptide: a gut hormone with anabolic functions. *J Mol Endocrinol* 2:169–174
- Yamada Y, Seino Y (2004) Physiology of GIP—a lesson from GIP receptor knockout mice. *Horm Metab Res* 36:771–774
- Hansotia T, Baggio LL, Delmeire D et al (2004) Double incretin receptor knockout (DIRKO) mice reveal an essential role for the enteroinsular axis in transducing the glucoregulatory actions of DPP-IV inhibitors. *Diabetes* 53:1326–1335
- Althage MC, Ford EL, Wang S, Tso P, Polonsky KS, Wice BM (2008) Targeted ablation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide-producing cells in transgenic mice reduces obesity and insulin resistance induced by a high fat diet. *J Biol Chem* 283:18365–18376
- McClellan PL, Irwin N, Cassidy RS, Holst JJ, Gault VA, Flatt PR (2007) GIP receptor antagonism reverses obesity, insulin resistance, and associated metabolic disturbances induced in mice by prolonged consumption of high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E1746–E1755
- Miyawaki K, Yamada Y, Yano H et al (1999) Glucose intolerance caused by a defect in the entero-insular axis: a study in gastric inhibitory polypeptide receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14843–14847
- Yamada C, Yamada Y, Tsukiyama K et al (2007) Genetic inactivation of GIP signaling reverses aging-associated insulin resistance through body composition changes. *Biochem Biophys Res Commun* 364:175–180
- Hansotia T, Maida A, Flock G et al (2007) Extrapancratic incretin receptors modulate glucose homeostasis, body weight, and energy expenditure. *J Clin Invest* 117:143–152
- Meier JJ, Nauck MA, Schmidt WE, Gallwitz B (2002) Gastric inhibitory polypeptide: the neglected incretin revisited. *Regul Pept* 107:1–13
- Welters HJ, Kulkarni RN (2008) Wnt signaling: relevance to beta-cell biology and diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 19:349–355
- Clevers H (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127:469–480
- Roose J, Clevers H (1999) TCF transcription factors: molecular switches in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1424:M23–M37
- Klein PS, Melton DA (1996) A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8455–8459
- Hedgepeth CM, Conrad LJ, Zhang J, Huang HC, Lee VM, Klein PS (1997) Activation of the Wnt signaling pathway: a molecular mechanism for lithium action. *Dev Biol* 185:82–91
- Ni Z, Anini Y, Fang X, Mills G, Brubaker PL, Jin T (2003) Transcriptional activation of the proglucagon gene by lithium and beta-catenin in intestinal endocrine L cells. *J Biol Chem* 278:1380–1387
- Yi F, Brubaker PL, Jin T (2005) TCF-4 mediates cell type-specific regulation of proglucagon gene expression by beta-catenin and glycogen synthase kinase-3 $\beta$ . *J Biol Chem* 280:1457–1464
- Gustafson B, Smith U (2008) WNT signalling is both an inducer and effector of glucagon-like peptide-1. *Diabetologia* 51:1768–1770



20. Boylan MO, Jepeal LI, Jarboe LA, Wolfe MM (1997) Cell-specific expression of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide gene in a mouse neuroendocrine tumor cell line. *J Biol Chem* 272:17438–17443
21. Jepeal LI, Fujitani Y, Boylan MO, Wilson CN, Wright CV, Wolfe MM (2005) Cell-specific expression of glucose-dependent-insulinotropic polypeptide is regulated by the transcription factor PDX-1. *Endocrinology* 146:383–391
22. Jepeal LI, Boylan MO, Michael Wolfe M (2008) GATA-4 upregulates glucose-dependent insulinotropic polypeptide expression in cells of pancreatic and intestinal lineage. *Mol Cell Endocrinol* 287:20–29
23. Fujita Y, Chui JW, King DS et al (2008) Pax6 and Pdx1 are required for production of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in proglucagon-expressing L cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:E648–E657
24. Pinto D, Gregorieff A, Begthel H, Clevers H (2003) Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* 17:1709–1713
25. Wang Y, Giel-Moloney M, Rindi G, Leiter AB (2007) Entero-endocrine precursors differentiate independently of Wnt and form serotonin expressing adenomas in response to active  $\beta$ -catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:11328–11333
26. Rindi G, Grant SG, Yiangou Y et al (1990) Development of neuroendocrine tumors in the gastrointestinal tract of transgenic mice. Heterogeneity of hormone expression. *Am J Pathol* 136:1349–1363
27. Schug J (2008) Using TESS to predict transcription factor binding sites in DNA sequence. *Curr Protoc Bioinformatics Chapter 2: Unit 2.6*
28. Munoz-Montano JR, Lim F, Moreno FJ, Avila J, Diaz-Nido J (1999) Glycogen synthase kinase-3 modulates neurite outgrowth in cultured neurons: possible implications for neurite pathology in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 1:361–378
29. Andrews NC, Faller DV (1991) A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 19:2499
30. Goodall J, Martinozzi S, Dexter TJ et al (2004) Brn-2 expression controls melanoma proliferation and is directly regulated by  $\beta$ -catenin. *Mol Cell Biol* 24:2915–2922
31. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–408
32. Jope RS (2003) Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. *Trends Pharmacol Sci* 24:441–443
33. Ryves WJ, Harwood AJ (2001) Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. *Biochem Biophys Res Commun* 280:720–725
34. Wada A, Yokoo H, Yanagita T, Kobayashi H (2005) Lithium: potential therapeutics against acute brain injuries and chronic neurodegenerative diseases. *J Pharmacol Sci* 99:307–321
35. Yanagita T, Maruta T, Uezono Y et al (2007) Lithium inhibits function of voltage-dependent sodium channels and catecholamine secretion independent of glycogen synthase kinase-3 in adrenal chromaffin cells. *Neuropharmacology* 53:881–889
36. Liang MH, Wendland JR, Chuang DM (2008) Lithium inhibits Smad3/4 transactivation via increased CREB activity induced by enhanced PKA and AKT signaling. *Mol Cell Neurosci* 37:440–453
37. Korinek V, Barker N, Morin PJ et al (1997) Constitutive transcriptional activation by a  $\beta$ -catenin-Tcf complex in APC<sup>-/-</sup> colon carcinoma. *Science* 275:1784–1787
38. Veeman MT, Slusarski DC, Kaykas A, Louie SH, Moon RT (2003) Zebrafish *prickle*, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. *Curr Biol* 13:680–685
39. Asally M, Yoneda Y (2005)  $\beta$ -catenin can act as a nuclear import receptor for its partner transcription factor, lymphocyte enhancer factor-1 (lef-1). *Exp Cell Res* 308:357–363
40. Lyssenko V, Lupi R, Marchetti P et al (2007) Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. *J Clin Invest* 117:2155–2163
41. Florez JC, Jablonski KA, Bayley N et al (2006) TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *N Engl J Med* 355:241–250
42. Miyawaki K, Yamada Y, Ban N et al (2002) Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. *Nat Med* 8:738–742
43. Chan CB, Pederson RA, Buchan AM, Tubesing KB, Brown JC (1984) Gastric inhibitory polypeptide (GIP) and insulin release in the obese Zucker rat. *Diabetes* 33:536–542
44. Pederson RA, Campos RV, Buchan AM, Chisholm CB, Russell JC, Brown JC (1991) Comparison of the enteroinsular axis in two strains of obese rat, the fatty Zucker and the JCR:LA-corpulent. *Int J Obes* 15:461–470
45. Brown JC, Otte S (1979) Clinical studies with gastric inhibitory polypeptide. *World J Surg* 3:553–558
46. Jones IR, Owens DR, Luzio S, Hayes TM (1989) Glucose dependent insulinotropic polypeptide (GIP) infused intravenously is insulinotropic in the fasting state in type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 21:23–26
47. Jones IR, Owens DR, Luzio S, Williams S, Hayes TM (1989) The glucose dependent insulinotropic polypeptide response to oral glucose and mixed meals is increased in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 32:668–677
48. Knop FK, Vilsboll T, Hojberg PV et al (2007) The insulinotropic effect of GIP is impaired in patients with chronic pancreatitis and secondary diabetes mellitus as compared to patients with chronic pancreatitis and normal glucose tolerance. *Regul Pept* 144:123–130
49. Meier JJ, Hucking K, Holst JJ, Deacon CF, Schmiegell WH, Nauck MA (2001) Reduced insulinotropic effect of gastric inhibitory polypeptide in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 50:2497–2504
50. Kim B, Kim SJ, Son JI, Joo YH (2008) Weight change in the acute treatment of bipolar I disorder: a naturalistic observational study of psychiatric inpatients. *J Affect Disord* 105:45–52

## Electronic supplementary material

ESM Table 1 Oligonucleotides used

Oligo name	Use	Sequence
LEF (consensus)	EMSA (na)	CA/TTCAAAGG
BRN2 (consensus)	EMSA (na)	5' GGTATCCACGTAAATCAAAGGGCGCAGAGCC 3'
TL1	EMSA, pos: +752	5' CTAGACCATCATCAAAGTGGCCTCT 3'
TL2	EMSA, pos: +573	5' CTAGACCCAGGCCTTTGTGCTTTCCTCTTCT 3'
TL5	EMSA, pos: -138	5' CTAGACCCAGGAGCAAAGGGGAAAGTGAT 3'
TL6	EMSA, pos: -368	5' CTAGATATGGCTTTGTGGGGGT 3'
TL7	EMSA, pos: -621	5' CTAGAAATATCTTTGTGGAAGGT 3'
TL8	EMSA, pos: -711	5' CTAGATCTCAAACAAAGCAAAAT 3'
Unrelated oligonucleotide	EMSA, pos: na	5' CTAGAGGGAATTTACACCTAGGTGTGAAATTCCT 3'
mGIP F	Cloning	5' CACAGACATACCTCTACCTCT 3'
mGIP R1	Cloning	5' CTGTTGGCTCTCAGGATCTT 3'
mGIP R2	Cloning	5' CTTCTAGATTCTGTCCCTA 3'
RT GIP F	qRT-PCR	5' GAAGAGGTTGAGTTCCGATCC 3'
RT GIP R	qRT-PCR	5' CCATGGCGATGCTGTAATCAC 3'
RT GLP F	qRT-PCR	5' ACATTACCCAGCGACTACAGC 3'
RT GLP R	qRT-PCR	5' TTGGCAATGTTGTTCCGGTT 3'

Oligo name	Use	Sequence
18S ribosomal, Control F	qRT-PCR	5' AGTCCCTGCCCTTTGTACACA 3'
18S ribosomal, Control R	qRT-PCR	5' GCCTCACTAAACCATCCAATCG 3'
ChIP GIP F4	Cloning/ChIP	5' GTTAATCACCCATTAGCACAGCC 3'
ChIP GIP R3	Cloning/ChIP	5' AAGATCCTGAGAGCCA 3'
ChIPGIPcontrol F1	ChIP	5' GAAGGATAGCCAGTCTGCAACC 3'
ChIPGIPcontrol R1	ChIP	5' CCAAAAAGTCCTTCCACAGACC 3'
ChIP GLP F3	ChIP	5' GGGTGAGTGATTTGTTTGCCTAG 3'
ChIP GLP R3	ChIP	5' AGCAAAGTGAGTGGGCGAGT 3'

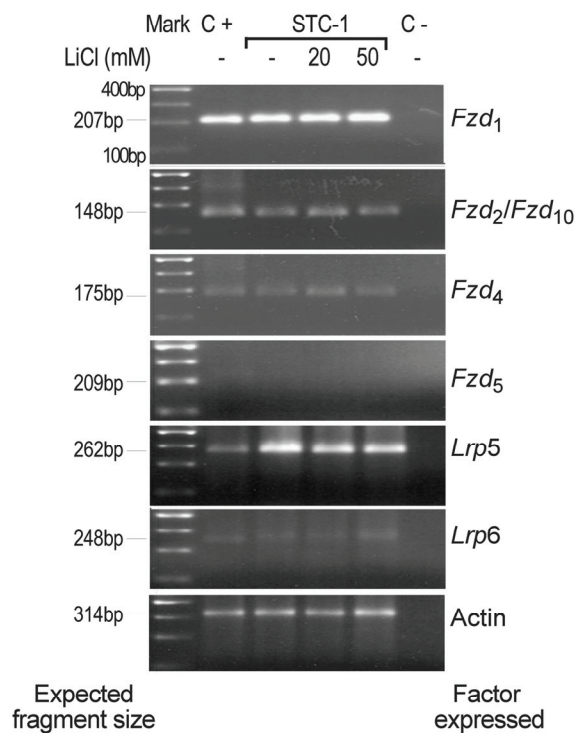
Oligonucleotides were used for EMSA assays, cloning, ChIP and RT-PCR

EMSA oligonucleotides were used for binding competition of endogenous TCF/LEF factors in STC-1 extracts to a consensus-labelled probe indicated as BRN2

TCF/LEF binding sites are underlined

na, not applicable; pos, indicates the position of the first base referred to the transcription start in *Gip* promoter; qRT-PCR, quantitative RT-PCR; TL1, -2, -5, -6, -7 and -8 correspond to putative TCF/LEF binding sites found in mouse *Gip* gene using TESS software as shown schematically in Fig. 5a

ESM FIGURE 1

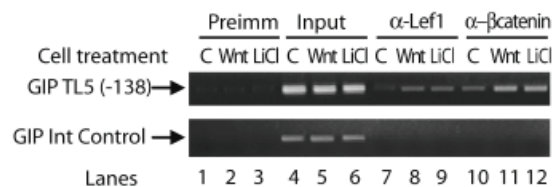


**ESM Fig. 1.** WNT receptors expressed in entero-endocrine STC-1 cells. RNA from cells treated or not with the indicated lithium concentrations were subjected to RT-PCR using primers indicated in ESM Table 2. A DNA molecular weight marker (Mark) (100 bp ladder) was used, with upper and lower band corresponding to 400 and 100 bp respectively (all seven gels), as indicated. C+, HT-29 cell line from colon used as positive control; C-, negative control. Water was used to show primer and product specificity (TIFF 2522 kb)

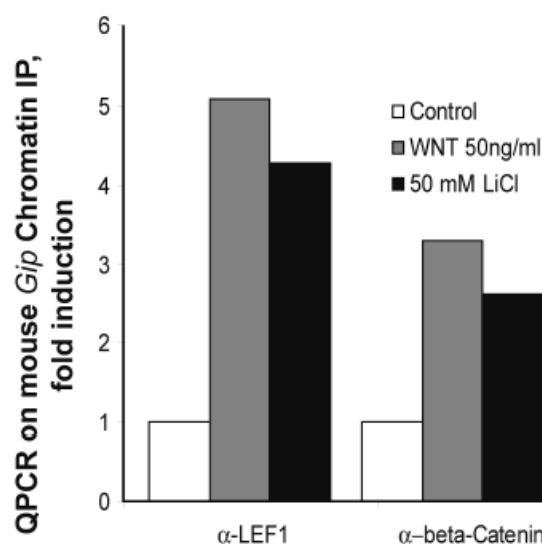


ESM Figure 2

a



b



**ESM Fig. 2** Lithium and WNT increase LEF1 and  $\beta$ -catenin binding to the TCF/LEF binding site (TL)5 in the mouse *Gip* promoter. Cells were cultured for 24 h with LiCl (50 mmol/l) or recombinant WNT3A (50 ng/ml). Cross-linked chromatin immunoprecipitated with anti-LEF1 or anti- $\beta$ -catenin antibodies and purified was analysed by PCR using primers specified in ESM Table 1. a Semiquantitative PCR showed that TL5 containing chromatin from cells treated with WNT or lithium binds LEF1 and  $\beta$ -catenin better than chromatin from control cells (compare lanes 8–9 with 7 and lanes 11–12 with 10). C, control cells. Preimm, preimmune serum was used to control the specificity of  $\alpha$ -LEF1 and  $\alpha$ - $\beta$  catenin antibodies. GIP Int Control, a sequence lacking TL sites from an intron in the mouse *Gip* gene is not bound nor immunoprecipitated. b Quantitative PCR (QPCR) on the immunoprecipitated chromatin. Values were normalised (subtraction of preimmune and division by input) and expressed as fold induction over chromatin immunoprecipitated from control (untreated) cells (PDF 670 kb)



# GLUCOSE INDUCED $\beta$ -CATENIN ACETYLATION ENHANCES WNT SIGNALING IN CANCER

---

Artículo en revisión en:

**Molecular Cell**

A CHOCARRO-CALVO

JM GARCIA-MARTINEZ

A DE LA VIEJA

C GARCIA-JIMENEZ



## **INTRODUCCIÓN AL CAPÍTULO 2**

### **La glucosa amplifica la señalización de WNT en cáncer promoviendo la acetilación de la $\beta$ -catenina**

En el trabajo anterior hemos demostrado que la síntesis de las incretinas está regulada por la señalización de WNT, tremendamente implicada en cáncer. Las incretinas controlan el metabolismo de forma global y en particular la glucemia. Las profundas alteraciones metabólicas que sufren las células tumorales con un consumo elevado de glucosa y aumento de la glucólisis en detrimento de la fosforilación oxidativa, sugieren que la glucosa podría afectar a la señalización implicada en el cáncer. Esta hipótesis estaría apoyada por numerosos estudios epidemiológicos que asocian una frecuencia aumentada de ciertos tipos de cáncer con la hiperglucemia y la diabetes. En este trabajo usamos los genes de las incretinas para estudiar si la glucosa altera la señalización por WNT que está implicada en cáncer.

Nuestros resultados demuestran que los niveles elevados de glucosa (como los alcanzados en la hiperglucemia) amplifican la señalización por WNT actuando sobre su efector, la  $\beta$ -catenina, y aumentando su retención nuclear. La glucosa y el litio, como mimético de la vía de WNT, regulan el balance de acetilación/desacetilación de la  $\beta$ -catenina aumentando los niveles de la p300, y favoreciendo sus interacciones con la  $\beta$ -catenina a la vez que disminuyen las interacciones entre la  $\beta$ -catenina y la SIRT1, y la actividad desacetilasa de las sirtuinas. En conjunto se favorece la acetilación y ello resulta en la retención nuclear de LEF1 y de la  $\beta$ -catenina, que activa la transcripción de los genes diana de la vía de WNT implicados en el control del metabolismo y la proliferación tumoral.

Nuestros resultados no se restringen a una línea celular sino que la amplificación por la glucosa de la señalización de WNT se da en células derivadas de tumores humanos de orígenes muy diversos. Nuestros estudios podrían tener importantes repercusiones en la prevención y el tratamiento de las enfermedades metabólicas y del cáncer, al poner de manifiesto un nuevo nexo, la vía de WNT, que relaciona la diabetes y el cáncer y nuevas dianas mecánicas (las acetilaciones, la p300 y las sirtuinas).



Elsevier Editorial System(tm) for Molecular Cell  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: GLUCOSE INDUCED beta-CATENIN ACETYLATION ENHANCES WNT SIGNALING IN  
CANCER

Article Type: Research Manuscript MOLECULAR-CELL-S-12-00075

Keywords: glucose; cancer; acetylation; Wnt; diabetes; incretin; insulin; transcription; signaling

Corresponding Author: DR CUSTODIA GARCIA-JIMENEZ, PhD

Corresponding Author's Institution: UNIVERSIDAD REY JUAN CARLOS

First Author: Ana Chocarro-Calvo, Biology and Biochemistry

Order of Authors: Ana Chocarro-Calvo, Biology and Biochemistry; Jose Garcia-Martinez, PhD  
BIOLOGY; Antonio De la Vieja, PhD Chemistry; CUSTODIA GARCIA-JIMENEZ, PhD

**Abstract:** Nuclear accumulation of beta-catenin, a widely recognized marker of poor cancer prognosis, drives cancer cell proliferation and senescence bypass, and also regulates incretins, critical regulators of fat and glucose metabolism. Diabetes, characterized by elevated blood glucose levels, is associated with increased cancer risk, in part because of increased IGF1 signaling, but whether elevated glucose directly impacts on cancer-associated signal transduction pathways is unknown. Here we show that glucose is essential for Wnt signaling by increasing beta-catenin acetylation and nuclear retention through alterations in the balance of p300 and sirtuins. Intra-nuclear accumulation of beta-catenin is followed by binding and activation of its target promoters under combined glucose and Wnt stimulation, but not with either stimulus alone. Our results reveal a novel mechanism by which high glucose enhances signaling through the cancer-associated Wnt/  $\beta$ -catenin pathway and may explain the increased frequency of cancer associated with obesity/diabetes.

**Highlights**

**Chocarro et al.**

**Glucose induced  $\beta$ -catenin acetylation enhances WNT signaling in cancer**

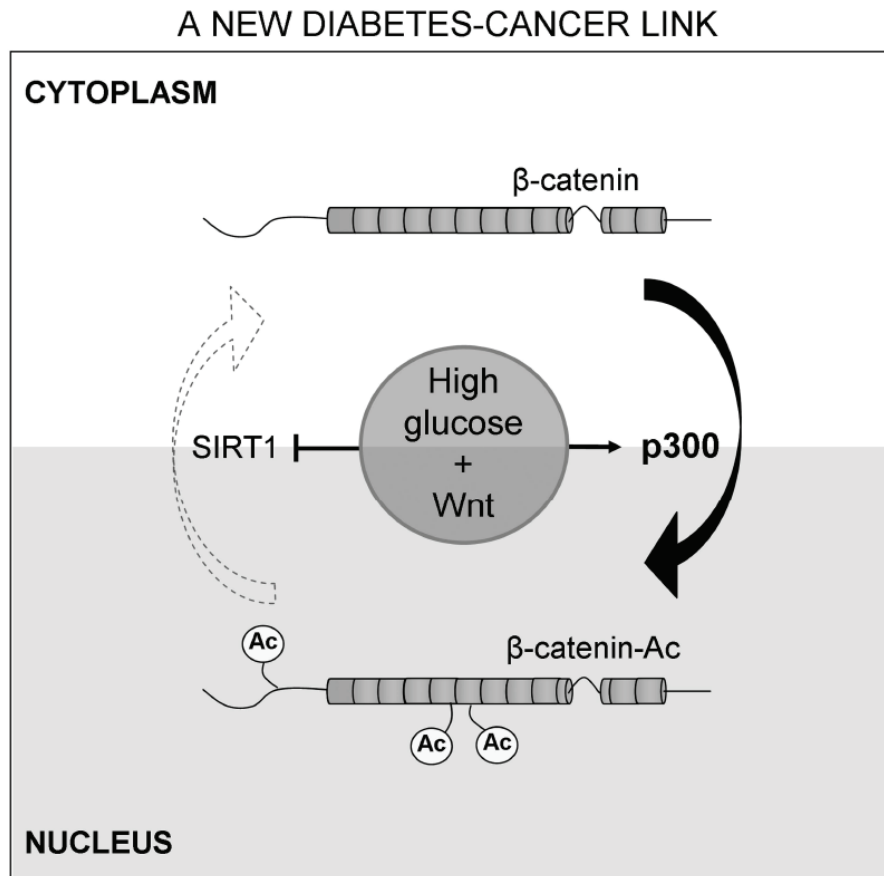
**RESEARCH HIGHLIGHTS:**

- Wnt signaling amplification by high glucose ties a cancer-related pathway to diabetes
- Upon Wnt signaling, high glucose is required for:
  - increased levels and interactions of the acetylase p300 with  $\beta$ -catenin
  - enhanced inhibition of the deacetylase activity of sirtuins.
  - nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin and transcriptional activity in tumor cells



Graphical Abstract

[Click here to download Graphical Abstract: Chocarro et al. Graphical Abstract.tif](#)



**\*Manuscript**

[Click here to view linked References](#)

**GLUCOSE INDUCED  $\beta$ -CATENIN ACETYLATION ENHANCES  
WNT SIGNALING IN CANCER**

**Ana Chocarro-Calvo<sup>1,&</sup>, Jose Manuel García-Martínez<sup>1,&</sup>, Antonio De la Vieja<sup>2</sup>  
and Custodia García-Jiménez<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Fisiología y Bioquímica. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Rey Juan Carlos, 28922 Alcorcon. Madrid. Spain

<sup>2</sup> Área de Biología Celular y Desarrollo. Instituto de Salud Carlos III – CNM. 28220 Majadahonda, Madrid, Spain.

<sup>&</sup> Ana Chocarro-Calvo and Jose Manuel García-Martínez contributed equally to this work.

<sup>\*</sup> contact: [custodia.garcia@urjc.es](mailto:custodia.garcia@urjc.es)

Running title: High glucose magnifies Wnt signaling

Key words: glucose, cancer, acetylation, Wnt, diabetes, incretin, insulin, transcription, signaling

**SUMMARY**

Nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin, a widely recognized marker of poor cancer prognosis, drives cancer cell proliferation and senescence bypass, and also regulates incretins, critical regulators of fat and glucose metabolism. Diabetes, characterized by elevated blood glucose levels, is associated with increased cancer risk, in part because of increased IGF1 signaling, but whether elevated glucose directly impacts on cancer-associated signal transduction pathways is unknown. Here we show that glucose is essential for Wnt signaling by increasing  $\beta$ -catenin acetylation and nuclear retention through alterations in the balance of p300 and sirtuins. Intra-nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin is followed by binding and activation of its target promoters under combined glucose and Wnt stimulation, but not with either stimulus alone. Our results reveal a novel mechanism by which high glucose enhances signaling through the cancer-associated Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and may explain the increased frequency of cancer associated with obesity/diabetes.

## INTRODUCTION

‘The dose makes the poison’ wrote Paracelsus in the sixteenth-century and it is especially relevant for diabetics in reference to glucose. Less known, although widely accepted, is that the obese and/or diabetic population has an increased frequency of certain cancers. Although increasingly important and strongly supported by epidemiological evidence (Gao and Yao, 2009; Gerber, 2009; Hillon et al., 2011; Khandekar et al., 2011; Renehan et al., 2008), little is known of the mechanistic origins of the diabetes/obesity-cancer link.

High insulin levels, as an adaptation to insulin resistance at the onset of diabetes or as a result of exogenous administration, may promote cell growth and cancer by acting through the Insulin Growth Factor receptor family (Pisani, 2008). However, hyperinsulinemia occurs secondary to hyperglycaemia and might not explain the increased cancer risk in the non-diabetic obese or hyperglycaemic populations. An alternative possibility is that high serum glucose levels may directly modulate cancer-related signalling pathways, especially given the increased glucose consumption characteristic of cancer cells (Warburg et al., 1967).

The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway is a global regulator of embryonic development, is required for tissue renewal in post-embryonic animals, for example in maintenance of stem cells in intestinal crypts (Korinek et al., 1998), and when deregulated can promote senescence bypass (Delmas et al., 2007), aberrant cell growth and cancer, (Barker et al., 2009; Kinzler and Vogelstein, 1996). As such, nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin is one of the most widely recognized markers of malignancy. Significantly, a strong genetic association between specific polymorphisms in the *TCF7L2* (TCF4) gene, an effector of the Wnt pathway and diabetes has been described (Lyssenko, 2008; Saxena et al., 2006) suggesting that Wnt/ $\beta$ -catenin may represent a link between diabetes and cancer.

The connections between Wnt signaling and diabetes, although increasingly recognized, are not straightforward. On glucose ingestion the body responds by secreting insulin to lower blood glucose levels and failure to do so leads to diabetes. The earliest response to glucose ingestion is the secretion by enteroendocrine cells of incretin hormones, which are required for glucose-dependent insulin

secretion and act on extra-pancreatic tissues to control global body energy balance, reviewed in (McIntosh et al., 2010). Glucose-dependent insulintropic peptide (GIP) accounts for 75% of incretin plasma levels (Nauck et al., 1989; Nauck et al., 1993), is responsible for pancreatic glucose-dependent insulin secretion, and its signaling is lost in diabetes (Flatt and Green, 2006). Wnt/ $\beta$ -catenin increases the expression of the incretin genes, *GIP* and *GCG* (proglucagon) in enteroendocrine cells (Garcia- Jimenez, 2010; Garcia-Martinez et al., 2009; Yi et al., 2005) and modulates incretin signaling in pancreatic beta cells (Liu and Habener, 2008). Thus, the control of global metabolism by Wnt signaling might be mediated at least partially through increased expression and signaling of incretins.

The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway is activated by Wnts binding to their co-receptors leading to inactivation of Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), a kinase that constitutively phosphorylates  $\beta$ -catenin to trigger its degradation, reviewed in (Wu and Pan, 2010). Wnt-induced  $\beta$ -catenin stabilization is required for its entry into the nucleus where it binds members of the T cell factor/Lymphoid enhancer factor such as LEF1 to activate transcription of target genes (Clevers, 2006). Although the regulation of  $\beta$ -catenin stabilization is well-characterized, the mechanisms that allow nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin are poorly understood.

Here we show that nuclear accumulation of stabilized  $\beta$ -catenin requires glucose in a wide range of human tumor-derived cell lines. The effect of glucose is mediated via its ability to promote the formation of a LEF1/ $\beta$ -catenin complex that associates with the acetylase p300 and displaces the SIRT1 deacetylase, leading to increased  $\beta$ -catenin acetylation, its nuclear accumulation and transcription activation. The results highlight a key mechanism that ties glucose levels to Wnt/ $\beta$ -catenin signaling that has important implications for both cancer and glucose homeostasis.

## RESULTS

### Glucose induction of *GIP* gene expression requires Wnt/lithium

Glucose is the physiological stimulus for GIP secretion, but whether glucose induces *GIP* transcription is not known. To examine the effect of glucose on *GIP* expression we transfected enteroendocrine

STC-1 cells with a *GIP* promoter-luciferase reporter (Garcia-Martinez et al., 2009) and asked whether glucose depletion affected basal *GIP* promoter activity. Figure 1A shows that after 24 h of glucose deprivation, the activity of the promoter undergoes a 50% reduction and by 48 h, 80% of basal *GIP* promoter activity disappears. The effect of glucose addition on *GIP* expression was then evaluated and compared to the effect of lithium, which is known to mimic WNT3A signaling in STC-1 cells, inducing *GIP* expression through a LEF/Tcf element in the proximal promoter (Garcia-Martinez et al., 2009). Surprisingly, neither lithium nor glucose alone induced the *GIP* promoter but in the presence of lithium, glucose induced a 2.2-fold increase in *GIP* promoter activity (Figure 1B). These data were confirmed for the endogenous *GIP* promoter (Figure 1C). Treatment with glucose or lithium alone promoted a modest induction of endogenous *GIP* (up to 2-fold) as determined using RT/qPCR. However, when glucose was added to cells growing with 20 mM lithium a robust induction up to 8-fold was obtained. The results suggest that glucose targets molecules regulated by Wnt/lithium and explain why induction of *GIP* by glucose has been so difficult to observe previously in enteroendocrine STC-1 cells.

#### **Glucose induction of the *GIP* promoter is mediated via a LEF/Tcf response element**

Since glucose induction required the presence of lithium, we asked whether glucose alters the responsiveness of a consensus Wnt-dependent element in STC-1 cells transfected with TOPFlash/FOPFlash reporters, bearing eight copies of the consensus LEF/Tcf binding site or its mutated version respectively (Korinek et al., 1997). Briefly, lithium modestly increased by 2.5-fold the TOP/FOP ratio (Figure 1D), whereas glucose alone was unable to activate this promoter. However, glucose substantially amplified the effect of lithium, increasing the TOP/FOP ratio up to 8-fold.

Since lithium induces *GIP* expression in enteroendocrine cells through stabilization of the Wnt effector  $\beta$ -catenin that is targeted to the proximal *GIP* promoter (Garcia-Martinez et al., 2009), we asked whether glucose also acted through this natural Wnt-responsive element. To this end, we transfected a series of *GIP* promoter deletion mutants and challenged them with glucose. Figure 1E shows that deletion of the promoter region containing the previously reported Wnt-dependent TL5

element (Garcia-Martinez et al., 2009) abrogated the response to glucose. Mutagenesis of the TL5 element confirmed that its integrity is required for glucose induction (Figure 1F). Thus, glucose enhances lithium/Wnt-dependent *GIP* expression through molecules that bind the WNT-dependent TL5 element.

### **Glucose is required for $\beta$ -catenin nuclear accumulation**

Since lithium (or WNT3A) induction of *GIP* relies on many intermediaries, we next explored which molecule was targeted by glucose that underlies enhanced *GIP* expression. Lithium and WNT3A inactivates GSK3 $\beta$  by phosphorylation at Ser9. However glucose did not modify GSK3 $\beta$  phosphorylation and did not increase  $\beta$ -catenin levels (Supplementary Figure 1). We then used immunocytochemistry to study whether  $\beta$ -catenin sub-cellular distribution was targeted by glucose (Figure 2A).  $\beta$ -catenin staining was restricted to focal adhesions in cells cultured in the absence of lithium and glucose (top left). Glucose alone did not alter the location of  $\beta$ -catenin (bottom left), whereas lithium increased  $\beta$ -catenin staining throughout the cytoplasm (top right). Strikingly, addition of both glucose and lithium resulted in accumulation of  $\beta$ -catenin in the nucleus and depletion of the cytoplasmic and membrane-bound fractions (bottom right). Western blotting on fractionated cell extracts revealed that nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin by glucose and lithium was a general cell response (Figure 2B). Lithium addition led, as expected, to cytoplasmic  $\beta$ -catenin accumulation without altering the small nuclear pool of  $\beta$ -catenin, while glucose alone neither altered  $\beta$ -catenin levels in the cytoplasm or in the nucleus. By contrast, glucose allowed the cytoplasmic pool of  $\beta$ -catenin accumulated via lithium-mediated inhibition of GSK3 $\beta$  to enter, accumulate, and be retained in the nucleus. Thus, in the absence of lithium, when excess  $\beta$ -catenin is degraded, glucose makes little effect. However when a previous stimulus drives  $\beta$ -catenin accumulation, glucose induces its nuclear retention and strongly enhances  $\beta$ -catenin effects on *GIP* induction. These results revealed that glucose-driven nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin underlies the induction of incretin expression mediated by glucose.

### **Glucose favors LEF1 interaction with $\beta$ -catenin to promote $\beta$ -catenin nuclear retention**

$\beta$ -catenin is unable to bind directly to DNA however it activates incretin expression by glucose upon Wnt/lithium stimulation through an element that binds Wnt effectors such as LEF1. LEF1 expression did not change significantly under glucose and lithium treatment (JMGM and CGJ, unpublished results). However, since  $\beta$ -catenin accumulates in the nucleus despite lacking a classical nuclear localisation signal (NLS) and LEF1 possesses its own NLS (Huber et al., 1996; Kim and Hay, 2001) and is able to interact with  $\beta$ -catenin, we asked whether glucose favored LEF1/ $\beta$ -catenin interaction as a possible mechanism for nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin. Immunoprecipitation of nuclear LEF1 revealed that while its interaction with  $\beta$ -catenin was not altered by single treatment with lithium or glucose (Figure 2C), addition of both glucose and lithium strongly enhanced  $\beta$ -catenin-LEF1 interaction indicating that lithium and glucose cooperate to selectively favor nuclear LEF1- $\beta$ -catenin interaction. To elucidate whether  $\beta$ -catenin/LEF1 interaction was required for nuclear entry, we tested the ability of a  $\beta$ -catenin mutant unable to interact with LEF1 ( $\Delta 19$   $\beta$ -catenin) (Orsulic and Peifer, 1996; Prieve and Waterman, 1999) to translocate after treatment with glucose and/or lithium. Sub-cellular fractionated extracts revealed that in contrast to endogenous  $\beta$ -catenin that underwent nuclear accumulation following glucose and lithium stimulation (Figure 2D), the  $\Delta 19$   $\beta$ -catenin mutant unable to bind LEF1 failed to respond to the combined glucose and lithium treatment. We conclude that the ability of  $\beta$ -catenin to be retained into the nucleus relies on the 19 amino acids that mediate its interaction with LEF1.

### **Glucose favours LEF1/p300 and inhibits LEF1/SIRT1 interactions.**

Since our results indicate that LEF1/ $\beta$ -catenin interaction is critical for nuclear accumulation, and acetylation/deacetylation of  $\beta$ -catenin through p300/CBP (Xu and Kimelman, 2007); (Wolf et al., 2002) and SIRT 1 (Firestein et al., 2008) impacts on its oncogenicity, we examined whether combined lithium and glucose treatment altered the levels of the acetylase p300 and the deacetylase SIRT1 and their interactions with LEF1. Both lithium and glucose independently increase nuclear p300 levels



(Figure 3A), and combined treatment with lithium and glucose results in an additional increase in p300. Despite the fact that SIRT1 levels were unaffected by these stimuli (Figure 3B) glucose addition reduced sirtuin activity by 40% in cells treated with lithium (Figure 3C). The effect of glucose was largely abolished by the sirtuin enhancer resveratrol, and was reproduced by the sirtuin inhibitor nicotinamide (NAA). Together, the results suggest that combined glucose and lithium treatment might profoundly alter the acetylation/deacetylation balance by increasing the acetylase p300 and reducing the de-acetylase activity of sirtuins.

Given that both p300 and SIRT1 activities control the localization of other transcription factors, and since we have identified LEF1/ $\beta$ -catenin complex formation as being critical for nuclear retention we immunoprecipitated LEF1 and examined whether glucose alters LEF1/p300 interactions (Figure 3D). Basal LEF1/p300 interaction is detected under any condition however, combined glucose and lithium treatment increases by 3.5-fold the level of LEF1/p300 complexes. By contrast, although LEF1/SIRT1 complexes are also detected under any condition, glucose alone increases by 2.5-fold these complexes but strikingly in the presence of lithium, glucose is unable to favour LEF1/SIRT1 interactions (Figure 3E). Thus, glucose in the presence of lithium promotes nuclear retention of LEF1/ $\beta$ -catenin, increase of LEF1/p300 and decrease of LEF1/SIRT1 complexes.

### **Glucose induces acetylation of $\beta$ -catenin and its nuclear retention**

Immunoprecipitation of nuclear  $\beta$ -catenin was then used to analyse whether glucose alters p300/ $\beta$ -catenin interaction (Figure 4A). Strikingly,  $\beta$ -catenin/p300 interaction was detected only in cells treated with both glucose and lithium and not in control cells, or cells with single glucose or lithium treatment. We next analysed whether glucose alters SIRT1/ $\beta$ -catenin interactions (Figure 4B) and found that although glucose alone increases more than 2-fold the  $\beta$ -catenin/SIRT1 complexes, in the presence of lithium and glucose  $\beta$ -catenin/SIRT1 interaction is disrupted. Collectively, the results indicate that combined glucose and lithium treatment increases p300/LEF1/ $\beta$ -catenin interaction while preventing SIRT1/LEF1 and SIRT1/ $\beta$ -catenin interaction and suggest that increased acetylation by p300 may be required for nuclear retention of the complex. Importantly, LEF1 complexes with p300

and SIRT1, although present under all conditions, are controlled by glucose and lithium in opposing ways. In contrast,  $\beta$ -catenin complex formation with p300 and LEF1 is restricted to combined glucose and lithium treatment. This may suggest that LEF1/ $\beta$ -catenin complex formation is required for proper p300/ $\beta$ -catenin interaction. The requirement of LEF1 to mediate p300/ $\beta$ -catenin interaction was then examined by transfecting cells with Myc-tagged wild type or  $\Delta 19$   $\beta$ -catenin mutant (unable to interact with LEF1) and treatment with lithium, glucose, both, or none. Anti-Myc immunoprecipitates were analysed for the presence of p300 (Figure 4C).  $\Delta 19$   $\beta$ -catenin not only is unable to bind LEF1, but is also unable to bind p300 under any conditions. By contrast, wild type  $\beta$ -catenin interacts with p300 only in cells treated with glucose and lithium (like endogenous  $\beta$ -catenin) the same conditions required for LEF1/ $\beta$ -catenin interactions, suggesting that a LEF1/ $\beta$ -catenin complex may recruit p300 more efficiently. The facilitation of p300/ $\beta$ -catenin interactions by LEF1 is supported by the fact that lithium alone induces accumulation of both  $\beta$ -catenin (Figure 2B) and p300 (Figure 3A), but  $\beta$ -catenin/p300 complexes are undetectable (Figure 4A). Glucose alone induces accumulation of p300 (Figure 3A) but without lithium  $\beta$ -catenin/p300 complexes are undetectable (Figure 4A). Thus, LEF1/ $\beta$ -catenin interaction appears critical for both p300 interaction and nuclear retention.

To test whether  $\beta$ -catenin acetylation is increased for nuclear accumulation we immunoprecipitated nuclear extracts with anti-acetyl-lysine antibody and detected  $\beta$ -catenin. The results (Figure 4D) show increased acetylated  $\beta$ -catenin in the nucleus under combined glucose and lithium treatment when p300 recruitment is favoured. If  $\beta$ -catenin acetylation is the critical step for its nuclear accumulation, p300 overexpression should substitute for glucose and enhance p300/ $\beta$ -catenin interaction and nuclear accumulation in lithium treated cells.

In fact, Figure 4E shows that in cells that overexpress Flag-p300, but not control cells, lithium-induced  $\beta$ -catenin accumulation is sufficient to increase its nuclear retention to levels similar to those seen with combined glucose and lithium in the absence of Flag-p300. Combined glucose and lithium treatment does not further increase nuclear  $\beta$ -catenin accumulation over the levels

reached by p300 overexpression, suggesting that p300 activity is the limiting step required for  $\beta$ -catenin nuclear retention.

Manipulation of the acetylation/deacetylation balance through the sirtuin activity with NAA or resveratrol (Figure 4F) shows that inhibition of sirtuin activity mimics the effect of glucose by increasing nuclear  $\beta$ -catenin accumulation while resveratrol-enhanced sirtuin activity blocks the effect of glucose on nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin. The immunocytochemistry shown in Figure 4G shows  $\beta$ -catenin location at the focal adhesions of control cells cultured in the absence of lithium (upper panel); as expected, lithium treatment results in cytoplasmic accumulation of  $\beta$ -catenin (second panel); both NAA and glucose (third and fourth panels respectively) result in similar accumulation of  $\beta$ -catenin inside the nucleus, while resveratrol prevents the nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin induced by glucose (lower panel). This figure summarises the effects of inhibition (NAA) or enhancement (resveratrol) of sirtuin activity on the sub-cellular localisation of  $\beta$ -catenin accumulated by lithium and highlights that nuclear retention of the Wnt effectors relies on fine tuning of the acetylation/deacetylation balance which is controlled by glucose.

#### **Glucose induced nuclear retention of LEF1- $\beta$ -catenin enhances its transcriptional activity.**

Our results indicate that glucose amplifies Wnt signaling by promoting the formation of a LEF1/ $\beta$ -catenin complex able to recruit p300 and unable to interact with SIRT1. This leads to nuclear accumulation of acetylated  $\beta$ -catenin. Thus, upon lithium stimulation glucose induces nuclear retention of the Wnt effectors by profound alterations in the balance of acetylation resulting from its actions on both acetylases and deacetylases. The impact of acetylation on the transcriptional functionality of Wnt effectors, was analyzed by comparing the ratio in the transcriptional activity of TOPFlash/FOPFlash reporters transfected into STC-1 cells cultured in the presence of lithium. The acetylation balance was manipulated with glucose, NAA and/or resveratrol (Figure 5A). In lithium stimulated cells, NAA inhibition of sirtuins mimics transcriptional induction by glucose through the LEF/Tcf elements present in the TOPFlash reporter, while resveratrol effectively blocks the glucose-driven induction.

The results indicate that glucose and lithium inhibition of sirtuins enhance Wnt-dependent transcriptional activation and suggest that similar mechanisms may alter transcription from the natural *GIP* promoter that bears a Wnt-responsive element. Figure 5B shows that in the presence of lithium, inhibition of sirtuins by NAA mimics glucose induction of the *GIP* promoter, and sirtuin enhancement by resveratrol blocks the glucose-dependent induction. The results are consistent with induced transcriptional activity of Wnt effectors through glucose-driven increased acetylation via p300 and inhibition of sirtuins.

The *in vivo* effects of glucose on the endogenous *GIP* promoter were then analyzed by chromatin immunoprecipitation using anti-LEF1 and anti- $\beta$ -catenin antibodies and primers specific to the region containing the functional LEF/Tcf element (Garcia-Martinez et al., 2009). Semi-quantitative PCR results on immunoprecipitates using anti-LEF1 and anti- $\beta$ -catenin antibodies are shown in Figure 5C. Both LEF1 and  $\beta$ -catenin are poorly bound in the absence of lithium and single treatment with glucose or lithium alone induces slight increases in the binding of both LEF1 and  $\beta$ -catenin. In the presence of lithium, glucose strongly enhances their binding to this promoter. Primers for an intron sequence of *GIP* without TCF/LEF elements serve as control and render no product after the immunoprecipitation (lower panel). Figure 5D shows the statistical analysis of qPCRs performed on immunoprecipitates from five biological replicates. Glucose induction of LEF1 and  $\beta$ -catenin binding in the presence of lithium is presented as the ratio of factor bound in the presence of glucose versus the factor bound in the absence of glucose. Results are presented on a log2 scale. Glucose increases the binding of LEF1 and especially that of  $\beta$ -catenin.

Thus, glucose amplifies Wnt-dependent activation of gene expression through enhanced binding of LEF1/ $\beta$ -catenin to its sites in chromatin. To test whether this amplification was restricted to the *GIP* promoter or was a general feature, other Wnt target genes were examined. The proglucagon gene, *GCG* that codifies for another incretin, GLP-1, and a critical proliferation regulator, *cyclin D* emerged as candidate genes regulated by glucose. The *GCG* and *cyclin D* promoters were screened for LEF1/ $\beta$ -catenin enhanced binding with chromatin immunoprecipitation as before (Figure 5E). As reported for

the *GIP* promoter in the presence of lithium, glucose increased binding of LEF1 and  $\beta$ -catenin at both the *GCG* and *cyclin D* promoters (Figure 5C, upper panels), whereas in the absence of lithium no changes were observed in  $\beta$ -catenin binding and only small increases were observed for LEF1. Thus, glucose enhances Wnt-dependent gene expression through increased acetylation allowing nuclear retention of  $\beta$ -catenin and enhancing productive binding to its target promoter elements.

### **Glucose amplifies Wnt/Lithium signaling in tumor cells of human origin**

Nuclear  $\beta$ -catenin is a well-known marker of malignancy in a wide range of cancers. Moreover, deregulated metabolism characterized by high glucose consumption directed towards glycolysis is a hallmark of cancer cells. We reasoned that high glucose uptake by cells could contribute to the tumor phenotype by promoting nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin to activate proliferation-related genes. We therefore assayed several tumor-derived cell lines to determine whether their intra-nuclear  $\beta$ -catenin accumulation was dependent on glucose (Figure 6A). Our data revealed that in the presence of lithium, all tumor-derived cell lines tested including enteroendocrine (STC-1), colon (HT-29), pancreas (AsPC-1), ovary (OVCAR3), and breast (MDA-MB-231), respond to high glucose by accumulating  $\beta$ -catenin in the nucleus. We then analyzed if increased LEF1 and  $\beta$ -catenin binding to the cyclin D promoter was depending on glucose (in the presence of lithium). Figure 6B shows representative semiquantitative PCR on the corresponding immunoprecipitates and increased binding of both LEF1 and  $\beta$ -catenin at the cyclin D promoter following combined treatment with glucose and lithium in HT-29 colon cancer cells. Ovarian cancer cell lines have also been examined with the same result (AC-C, JMG-M and CG-J, unpublished results). Thus, we conclude that high glucose amplifies Wnt signaling by ensuring high intra-nuclear LEF1/ $\beta$ -catenin accumulation and binding to its target promoters.

## DISCUSSION

Understanding how glucose triggers increased incretin expression to regulate the insulin response is of fundamental importance, since deregulation of insulin secretion leads to diabetes, and deregulation of insulin signaling predisposes to cancer (Efeyan and Sabatini, 2010; Gualberto and Pollak, 2009). Although increased insulin/IGFR signaling are likely to play a key role in the diabetes/cancer link, nutrients and energy may signal in cancer through metabolic targets such as mTOR (Morton et al., 2011);(Yecies and Manning, 2011) or FGF21 (Mashili et al., 2011). Since targeting the metabolic sensor AMPK with metformin diminishes cancer mortality among diabetics (Dowling et al., 2007; Libby et al., 2009), many anti-cancer drugs directed towards metabolic pathways are being developed (Tennant et al., 2010). Importantly, elevated serum glucose levels in diabetes are associated with increased cancer risk (Giovannucci et al. 2010; Vigneri, 2009), which suggests that components of the glucose homeostasis mechanism impact on key cancer-associated signaling pathways. Epidemiological studies strongly link glycemic index to cancer risk (Gnagnarella et al., 2008), yet the precise mechanisms underpinning these important observations remain to be fully elucidated. Our results indicate that elevated glucose itself enhances Wnt signaling, a well-characterized cancer-associated pathway.

Despite the importance of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling for development, tissue renewal and cancer, the mechanisms by which  $\beta$ -catenin enters and is retained in the nucleus under Wnt stimulation are poorly understood. Entrance of  $\beta$ -catenin to the nucleus followed by export and degradation might be a physiological property and perhaps in cancer cells nuclear retention is distinctly targeted.

Nuclear entry of  $\beta$ -catenin (which lacks a classical NLS) is likely to depend on interactions with other molecules, such as LEF1, with their own NLS. Consistent with this, overexpression of LEF1 results in nuclear entry of  $\beta$ -catenin, (Kim et al., 2001). Our results also support this idea because glucose and lithium promote endogenous LEF1 redistribution to the nucleus and LEF1/ $\beta$ -catenin interaction correlates with nuclear  $\beta$ -catenin retention. However, lack of LEF1 interaction in the  $\Delta 19\beta$ -

catenin mutant (Prieve et al., 1999) does not prevent nuclear entry but abolishes nuclear retention. This suggests that combined glucose and lithium induction of LEF1/ $\beta$ -catenin complexes is critical for nuclear retention but not for nuclear entry.

Acetylation of  $\beta$ -catenin appears to be critically involved in nuclear entry. Over expressed p300/CBP interact with and acetylate  $\beta$ -catenin (Hecht et al., 2000; Labalette et al., 2004; Miyagishi et al., 2000; Sun et al., 2000) leading to acetylation of lysine residues within the armadillo (arm) repeats of  $\beta$ -catenin that may facilitate nuclear entry (Wolf et al., 2002), and  $\beta$ -catenin acetylation by p300/CBP increases its oncogenic potential (Ma et al., 2005). However, while overexpressed p300/CBP can acetylate  $\beta$ -catenin, the physiological trigger was not previously identified. Our results indicate that glucose increases  $\beta$ -catenin acetylation and nuclear retention via both by increased levels and interactions of p300 with  $\beta$ -catenin previously accumulated by Wnt signaling, and by decreased sirtuin activity.

How acetylation impacts on nuclear accumulation remains unclear. Acetylation of  $\beta$ -catenin by p300/CBP increases its binding to TCF/LEF factors (Levy et al., 2004; Xu et al., 2007), providing a mechanism for nuclear entry and perhaps retention. Single lithium or glucose treatment leads to increased p300 levels but not to p300/ $\beta$ -catenin interactions, further supporting that LEF1/ $\beta$ -catenin complex is necessary to stabilize p300/ $\beta$ -catenin interactions and for nuclear retention. However exogenously overexpressed p300 overcomes the LEF1 requirement and mimics the effect of glucose on lithium stimulated cells.

SIRT1 deacetylates  $\beta$ -catenin decreasing its oncogenic capacity (Firestein et al., 2008; Pruitt et al., 2006). Our results show that glucose alone enhances sirtuin interactions with LEF1 and  $\beta$ -catenin without altering sirtuin activity. Upon lithium stimulation, glucose inhibits sirtuin activity and interactions. Consistent with this, NAA inhibition of sirtuins mimics glucose-driven nuclear retention of  $\beta$ -catenin and its transcriptional activation while enhancing sirtuin activity with resveratrol blocks glucose effects. Since tumor cells exhibit enhanced glycolysis, obtaining much lower energy per molecule of glucose than normal cells that perform respiration, we may speculate that under lithium

stimulation high glucose uptake may speed up glycolysis and each molecule of NAD<sup>+</sup> obtained by lactic acid production is rapidly used in the next round of glycolysis to obtain ATP, limiting the amount the sirtuin co-factor and their activity.

In the presence of lithium glucose performs complementary functions directed towards enhancing nuclear accumulation of acetylated  $\beta$ -catenin. First, it increases p300 expression and enhances its interactions with LEF1 and  $\beta$ -catenin; second, it inhibits sirtuin activity and interactions with Wnt effectors. Together these events lead to increased  $\beta$ -catenin acetylation and consequent nuclear accumulation. To our knowledge, neither the disparate effects of glucose on sirtuins in the presence or absence of lithium, nor the requirement of glucose for massive  $\beta$ -catenin nuclear accumulation has been previously reported.

Our results also imply that the glucose-responsiveness of enteroendocrine cells will require an autocrine or paracrine source of either Wnt, or an alternative  $\beta$ -catenin-stabilizing signal, to enable glucose-dependent incretin secretion and subsequent release of insulin by the pancreas. The identification of the source and nature of signals that stimulate the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway to cooperate with glucose in mediating incretin production is a key issue. Since cancer cells are a well-characterized source of autocrine Wnt signaling (Bafico et al., 2004; Schlange et al., 2007), the impact of  $\beta$ -catenin accumulation on tumor progression may be critically dependent on glucose availability. This notion is reinforced by our finding that glucose and lithium synergize to promote nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin in a wide range of cell lines derived from diverse cancer types and by the glucose requirement observed in macrophages for autocrine activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway (Anagnostou and Shepherd, 2008). LEF1/ $\beta$ -catenin driven gene expression in a high glucose microenvironment could be used by tumor cells to promote proliferation and/or invasion. Wnt signaling, and its modulation by nutrients such as glucose may reveal relatively unexplored targets in metabolic disease.



## **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

### **Cell Culture, Western blotting and Co-Immunoprecipitation**

Tumor enteroendocrine STC-1, ovary carcinoma OVCAR-3, mammary adenocarcinoma MDA-MB-231 and colorectal adenocarcinoma HT-29 cells cultured in DMEM with 10% fetal bovine serum (FBS) were starved of glucose for 36h and stimulated with 25 mM glucose and/or 20 mM LiCl for 24 h as indicated. Pancreatic carcinoma AsPC-1 cells were cultured in RPMI with 10% FBS.

Nuclear extracts were prepared as described (Andrews and Faller, 1991). Proteins coimmunoprecipitated using anti-LEF1 (H-70), anti- $\beta$ -catenin (C-18), anti-Myc (9E10) (Santa Cruz Biotechnology) or anti-Acetylated-Lysine (#9441; Cell Signaling) were bound to protein A/G-coated magnetic beads (Invitrogen), and analyzed by western blotting with anti- $\beta$ -catenin (C-18), anti-p300 (C-20), anti-total ERK2 (C-14), all antibodies (Santa Cruz Biotechnology) or with anti-Sirt1 (Millipore).

### **Plasmids and transient transfections**

QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) and appropriate primers (Supplementary Table I) were used for mutagenesis of the TCF/LEF (TL5) binding site. Gip-Luciferase, Super8XTOPFlash and Super8XFOPflash have been described previously (Garcia-Martinez et al., 2009). For luciferase assays cells seeded in 24 well plates at 50% confluence were transfected with Luciferase and Renilla reporters (125 and 25 ng/well respectively), using JetPei PolyPlus reagent (Genycell Biotech) and analysed using the Dual Luciferase kit and Luminometer Glomax 96 (Promega). For protein expression, STC-1 cells were transiently transfected with 10 $\mu$ g of the Myc- $\beta$ -catenin WT and mutant Myc- $\Delta$ 19- $\beta$ -catenin or with Flag-p300 expression plasmids (gifts from. Marian L. Waterman and Colin Goding respectively). 24h post-transfection cells were treated with lithium, glucose or both for 24h and nuclear extracts were analyzed by western blotting.

### **Immunocytochemistry**

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS pH 7.4, permeabilized with 0.5% Triton X-100, blocked with 5% BSA, incubated with primary anti- $\beta$ -catenin (C-18) antibody, washed and incubated

with biotinylated secondary antibody (Vector Laboratories Inc.) before processing according to the immunoperoxidase procedure (ABC kit, Elite, Vector Burlingame).

### **SIRT1 Activity Assay**

SIRT1 deacetylase activity was measured using a SIRT-Glo™ Assay kit (Promega), following the protocol provided. After glucose starvation, cells were stimulated with glucose and/or LiCl and treated with 300  $\mu$ M nicotinamide or 50  $\mu$ M resveratrol for 24h as indicated. For each reaction, 1  $\mu$ g of protein was incubated with SIRT-Glo™ Reagent Mix at room temperature for 30 min and the product measured by luminescence.

### **Quantitative RT-PCRs**

Primers used are specified in Supplementary Table I; 18S rRNA primers served as non-regulated control. Relative expression was calculated using the Ct method and expressed as  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak and Schmittgen, 2001). PCR efficiency was ~100%. Reagents and detection systems were from Applied Biosystems.

### **Chromatin immunoprecipitation**

The antibodies and primers used and the procedure for chromatin immunoprecipitation was as described earlier (Garcia-Martinez et al., 2009). Other primers are listed at Supplementary Table I. Values represent statistical analysis (see below) and presented as the ratio: +lithium/–lithium.

### **Statistical analysis**

Results are presented as fold induction, mean $\pm$ SEM, from at least three biological replicas for luciferase assays, western blots and RT-PCR, or from five biological replicas for chromatin immunoprecipitation (ChIP). Tests for significance were with ANOVA and Bonferroni's post test. Differences were considered statistically significant if  $p < 0.05$ . \* $p < 0.1$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$ .

### **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was financed by a Fundación Mutua Madrileña FMM 2007-2010 to CGJ and FIS PS09-1387 to A De la Vieja. ACC and JMGM were supported by a fellowship and a teaching contract from Universidad Rey Juan Carlos respectively.

## REFERENCES

- Anagnostou, S.H., and Shepherd, P.R. (2008). Glucose Induces an Autocrine Activation of the Wnt/Beta-Catenin Pathway in Macrophage Cell Lines. *Biochem J* 416, 211-218.
- Andrews, N.C., and Faller, D.V. (1991). A Rapid Micropreparation Technique for Extraction of DNA Binding Proteins from Limiting Numbers of Mammalian Cells. *Nucleic Acids Res* 19, 2499.
- Barker, N., Ridgway, R.A., van Es, J.H., van de Wetering, M., Begthel, H., van den Born, M., Danenberg, E., Clarke, A.R., Sansom, O.J., and Clevers, H. (2009). Crypt Stem Cells as the Cells-of-Origin of Intestinal Cancer. *Nature* 457, 608-611.
- Clevers, H. (2006). Wnt/Beta-Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* 127, 469-480.
- Delmas, V., Beermann, F., Martinozzi, S., Carreira, S., Ackermann, J., Kumasaka, M., Denat, L., Goodall, J., Luciani, F., Viros, A., *et al.* (2007). Beta-Catenin Induces Immortalization of Melanocytes by Suppressing P16ink4a Expression and Cooperates with N-Ras in Melanoma Development. *Genes Dev* 21, 2923-2935.
- Efeyan, A., and Sabatini, D.M. (2010). Mtor and Cancer: Many Loops in One Pathway. *Curr Opin Cell Biol* 22, 169-176.
- Firestein, R., Blander, G., Michan, S., Oberdoerffer, P., Ogino, S., Campbell, J., Bhimavarapu, A., Luikenhuis, S., de Cabo, R., Fuchs, C., *et al.* (2008). The Sirt1 Deacetylase Suppresses Intestinal Tumorigenesis and Colon Cancer Growth. *PLoS One* 3, e2020.
- Flatt, P.R., and Green, B.D. (2006). Nutrient Regulation of Pancreatic Beta-Cell Function in Diabetes: Problems and Potential Solutions. *Biochem Soc Trans* 34, 774-778.
- Gao, C., and Yao, S.K. (2009). Diabetes Mellitus: A "True" Independent Risk Factor for Hepatocellular Carcinoma? *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 8, 465-473.
- Garcia-Jimenez, C. (2010). Wnt and Incretin Connections. *Vitamins and hormones* 84, 355-387.
- Garcia-Martinez, J.M., Chocarro-Calvo, A., Moya, C.M., and Garcia-Jimenez, C. (2009). Wnt/Beta-Catenin Increases the Production of Incretins by Entero-Endocrine Cells. *Diabetologia* 52, 1913-1924.
- Gerber, M. (2009). Background Review Paper on Total Fat, Fatty Acid Intake and Cancers. *Ann Nutr Metab* 55, 140-161.
- Gnagnarella, P., Gandini, S., La Vecchia, C., and Maisonneuve, P. (2008). Glycemic Index, Glycemic Load, and Cancer Risk: A Meta-Analysis. *Am J Clin Nutr* 87, 1793-1801.
- Gualberto, A., and Pollak, M. (2009). Emerging Role of Insulin-Like Growth Factor Receptor Inhibitors in Oncology: Early Clinical Trial Results and Future Directions. *Oncogene* 28, 3009-3021.
- Hillon, P., Guiu, B., Vincent, J., and Petit, J.M. (2011). Obesity, Type 2 Diabetes and Risk of Digestive Cancer. *Gastroenterologie clinique et biologique* 34, 529-533.
- Huber, O., Korn, R., McLaughlin, J., Ohsugi, M., Herrmann, B.G., and Kemler, R. (1996). Nuclear Localization of Beta-Catenin by Interaction with Transcription Factor Lef-1. *Mech Dev* 59, 3-10.
- Khandekar, M.J., Cohen, P., and Spiegelman, B.M. (2011). Molecular Mechanisms of Cancer Development in Obesity. *Nature reviews* 11, 886-895.
- Kim, K., and Hay, E.D. (2001). New Evidence That Nuclear Import of Endogenous Beta-Catenin Is Lef-1 Dependent, While Lef-1 Independent Import of Exogenous Beta-Catenin Leads to Nuclear Abnormalities. *Cell Biol Int* 25, 1149-1161.
- Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell* 87, 159-170.
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P.J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Clevers, H. (1997). Constitutive Transcriptional Activation by a Beta-Catenin-Tcf Complex in Apc-/- Colon Carcinoma. *Science* 275, 1784-1787.
- Korinek, V., Barker, N., Willert, K., Molenaar, M., Roose, J., Wagenaar, G., Markman, M., Lamers, W., Destree, O., and Clevers, H. (1998). Two Members of the Tcf Family Implicated in Wnt/Beta-Catenin Signaling During Embryogenesis in the Mouse. *Mol Cell Biol* 18, 1248-1256.
- Liu, Z., and Habener, J.F. (2008). Glucagon-Like Peptide-1 Activation of Tcf712-Dependent Wnt Signaling Enhances Pancreatic Beta Cell Proliferation. *J Biol Chem* 283, 8723-8735.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative Pcr and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.

- Lyssenko, V. (2008). The Transcription Factor 7-Like 2 Gene and Increased Risk of Type 2 Diabetes: An Update. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11, 385-392.
- Ma, H., Nguyen, C., Lee, K.S., and Kahn, M. (2005). Differential Roles for the Coactivators Cbp and P300 on Tcf/Beta-Catenin-Mediated Survivin Gene Expression. *Oncogene* 24, 3619-3631.
- Mashili, F.L., Austin, R.L., Deshmukh, A.S., Fritz, T., Caidahl, K., Bergdahl, K., Zierath, J.R., Chibalin, A.V., Moller, D.E., Kharitonov, A., *et al.* (2011). Direct Effects of Fgf21 on Glucose Uptake in Human Skeletal Muscle: Implications for Type 2 Diabetes and Obesity. *Diabetes Metab ResRev* 27, 286-297.
- McIntosh, C.H., Widenmaier, S., and Kim, S.J. (2010). Pleiotropic Actions of the Incretin Hormones. *Vitamins and hormones* 84, 21-79.
- Morton, J.P., Myant, K.B., and Sansom, O.J. (2011). A Fak-Pi-3k-Mtor Axis Is Required for Wnt-Myc Driven Intestinal Regeneration and Tumorigenesis. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 10, 173-175.
- Nauck, M., Schmidt, W.E., Ebert, R., Strietzel, J., Cantor, P., Hoffmann, G., and Creutzfeldt, W. (1989). Insulinotropic Properties of Synthetic Human Gastric Inhibitory Polypeptide in Man: Interactions with Glucose, Phenylalanine, and Cholecystokinin-8. *J Clin Endocrinol Metab* 69, 654-662.
- Orsulic, S., and Peifer, M. (1996). An in Vivo Structure-Function Study of Armadillo, the Beta-Catenin Homologue, Reveals Both Separate and Overlapping Regions of the Protein Required for Cell Adhesion and for Wingless Signaling. *J Cell Biol* 134, 1283-1300.
- Pisani, P. (2008). Hyper-Insulinaemia and Cancer, Meta-Analyses of Epidemiological Studies. *Arch Physiol Biochem* 114, 63-70.
- Prieve, M.G., and Waterman, M.L. (1999). Nuclear Localization and Formation of Beta-Catenin-Lymphoid Enhancer Factor 1 Complexes Are Not Sufficient for Activation of Gene Expression. *Mol Cell Biol* 19, 4503-4515.
- Renahan, A.G., Tyson, M., Egger, M., Heller, R.F., and Zwahlen, M. (2008). Body-Mass Index and Incidence of Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Observational Studies. *Lancet* 371, 569-578.
- Saxena, R., Gianniny, L., Burt, N.P., Lyssenko, V., Giorducci, C., Sjogren, M., Florez, J.C., Almgren, P., Isomaa, B., Orho-Melander, M., *et al.* (2006). Common Single Nucleotide Polymorphisms in Tcf7l2 Are Reproducibly Associated with Type 2 Diabetes and Reduce the Insulin Response to Glucose in Nondiabetic Individuals. *Diabetes* 55, 2890-2895.
- Warburg, O., Geissler, A.W., and Lorenz, S. (1967). [on Growth of Cancer Cells in Media in Which Glucose Is Replaced by Galactose]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 348, 1686-1687.
- Wolf, D., Rodova, M., Miska, E.A., Calvet, J.P., and Kouzarides, T. (2002). Acetylation of Beta-Catenin by Creb-Binding Protein (Cbp). *J Biol Chem* 277, 25562-25567.
- Wu, D., and Pan, W. (2010). Gsk3: A Multifaceted Kinase in Wnt Signaling. *Trends in biochemical sciences* 35, 161-168.
- Xu, W., and Kimelman, D. (2007). Mechanistic Insights from Structural Studies of Beta-Catenin and Its Binding Partners. *J Cell Sci* 120, 3337-3344.
- Yecies, J.L., and Manning, B.D. (2011). Mtor Links Oncogenic Signaling to Tumor Cell Metabolism. *J Mol Med* 89, 221-228.
- Yi, F., Brubaker, P.L., and Jin, T. (2005). Tcf-4 Mediates Cell Type-Specific Regulation of Proglucagon Gene Expression by Beta-Catenin and Glycogen Synthase Kinase-3beta. *J Biol Chem* 280, 1457-1464.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Glucose enhances *GIP* expression acting through WNT/lithium effectors.** (A) STC-1 cells transfected with the GIP-Luciferase reporter were deprived of glucose as indicated. (B) Cells transfected with the GIP-Luciferase reporter were deprived of glucose for 36h and stimulated with 25 mM glucose or/and 20 mM lithium. (C) Quantitative RT-PCR of *GIP* mRNA in cells deprived of glucose for 36h and stimulated with 25 mM glucose or/and 20 mM lithium. Values normalised with the endogenous control (18S) are referred as fold induction over untreated cells. (D) The ratio of TOPFlash/FOPFlash induction by glucose and/or lithium as indicated. (E, F) Glucose induction of the indicated GIP-luciferase reporters. The Wnt-responsive Wt or mutated TL5 element is indicated. In all experiments, Relative Luciferase Units (RLU) were calculated as fold induction relative to the corresponding control. Values represent mean $\pm$ SEM;  $n\geq 3$ .

**Figure 2. Glucose promotes LEF1/ $\beta$ -catenin interaction and nuclear accumulation.** STC-1 cells were cultured with or without lithium, glucose or both as in Fig.1. Statistic analysis by ANOVA. (A)  $\beta$ -catenin immunocytochemistry in STC-1 cells (B)  $\beta$ -catenin protein localisation analyzed by westernblotting of cytoplasmic (CE) and nuclear (NE) extracts. Statistical analysis ( $n=5$ ) and representative western-blot; Erk2: loading control. (C) Western blot showing  $\beta$ -catenin in anti-LEF1 immunoprecipitates from cells grown under indicated conditions. Statistic analysis ( $n=3$ ) and representative western-blot. The amount of Erk2 in the flow through is shown as loading control; Input (10%) is shown. (D) Western-blot of nuclear extracts from cells expressing myc-tagged  $\Delta 19$   $\beta$ -catenin. Representative western-blot with Erk2 shown as loading control, left and Statistic analysis ( $n=3$ ), right.

**Figure 3. Glucose targets the acetylase p300, the deacetylase activity of sirtuins and their interactions with LEF1.** (A, B). Western-blot of STC-1 nuclear extracts after glucose and lithium treatment using anti-p300 or anti-SIRT1 antibodies. Statistical analysis ( $n=3$ ) and representative western-blot; Erk2: loading control. (C) NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase activity in STC-1 cells cultured with 20 mM lithium and 25 mM glucose, the sirtuin inhibitor nicotinamide (NAA 300  $\mu$ M) or the

sirtuin enhancer resveratrol (RES 50  $\mu$ M) as indicated. Deacetylase activity was measured as Relative Luciferase Units (RLU) and was calculated as fold induction relative to the corresponding control. Values represent mean $\pm$ SEM;  $n\geq 3$ . **(D, E)** Western blot using anti-p300 or anti-SIRT1 antibodies following immunoprecipitation of LEF1 from from STC-1 nuclear extracts treated as indicated. Statistical analysis by ANOVA ( $n=3$ ) and representative western-blot. The amount of Erk2 in the flow through is shown as loading control; Input (10%) is shown.

**Figure 4. Glucose and lithium target p300 and SIRT1 to induce nuclear accumulation of acetylated  $\beta$ -catenin.** **(A,B)** Immunoprecipitation of endogenous  $\beta$ -catenin from nuclear extracts of STC-1 treated with glucose, lithium, none or both as before, followed by immuno blotting for p300 (A), SIRT1 (B). Statistical analysis by ANOVA ( $n=3$ ) and representative western-blots. The amount of Erk2 in the flow through is shown as loading control; Input (10%) is shown. **(C)** Immunoprecipitation of transiently transfected Myc-tagged wild type or Myc-tagged mutant  $\Delta 19$   $\beta$ -catenin Western blotted using anti-Myc, or anti-p300 under indicated conditions **(D)** Immunoprecipitation using anti-acetyllysine followed by western blotting for  $\beta$ -catenin. **(E)** STC-1 cells grown under indicated conditions were transfected with Flag-tagged p300 and western blotted for p300 and  $\beta$ -catenin. Erk2 immunoblotting serves as a loading control. Representative westerns and statistical analysis by ANOVA from three independent experiments are shown. **(F)** Western-blot analysis of  $\beta$ -catenin from STC-1 cells grown in the presence or absence of glucose or indicated combinations of nicotinamide (NAA, 300  $\mu$ M) or Resveratrol (RES, 50  $\mu$ M). Representative western-blot and statistical analysis by ANOVA of 3 independent experiments of cells. **(G)** Immunocytochemistry for  $\beta$ -catenin of STC-1 cells grown under indicate conditions as in (F) .

**Figure 5. Glucose induced LEF1/ $\beta$ -catenin transcriptional induction is mimicked by sirtuin regulation and increases LEF1 and  $\beta$ -catenin binding to chromatin *in vivo*.** **(A, B)** STC1 cells transfected with a GIP-luciferase reporter (A) or TOPFlash and FOPFlash reporters (B) were cultured

in the presence of lithium and stimulated with nicotinamide (NAA, 300  $\mu$ M), 25 mM glucose and/or resveratrol (RES, 50  $\mu$ M). Relative Luciferase Units (RLU) was calculated as fold-induction relative to the corresponding control. Values represent mean $\pm$ SEM;  $n\geq 3$ . RLU express the ratio of TOPFlash/FOPFlash induction. **(C-E)** Chromatin immunoprecipitation followed by PCR shows glucose-induced enhanced binding of LEF1 or  $\beta$ -catenin at target promoters *in vivo*. **(C)** Semiquantitative PCR on the TL5-containing region of *GIP* promoter. The TCF/LEF-free region of the first intron of *GIP* gene is used as a negative control. Immunoprecipitation using pre-immune serum and from input chromatin are additional controls. **(D)** Quantitative PCR of ChIP results on the *GIP* promoter. Normalized values calculated as fold induction of samples treated with glucose in the presence versus absence of lithium. Values are presented as mean $\pm$ SEM ( $n=5$ ) on a log<sub>2</sub> scale. **(E)** Semi-quantitative PCR at the promoters of *proglucagon* (*GCG*) and *cyclin D* genes. *GAPDH* is a control gene not regulated by Wnt.

**Figure 6. Glucose is required for intra-nuclear  $\beta$ -catenin accumulation in human tumor-derived cell lines and enhances binding of LEF1  $\beta$ -catenin to target promoters.** **A** Western blot analysis of  $\beta$ -catenin, p300 and ERK2 from indicated cell lines cultured  $\pm$  LiCl (20 mM) or/and glucose (25 mM) showing representative gels and statistical analysis ( $n=3$ ). **(B)** Chromatin was immunoprecipitated from HT-29 colon cancer cells. ChIP was followed by semi-quantitative PCR as in Figure 5.

Figure  
Fig 1

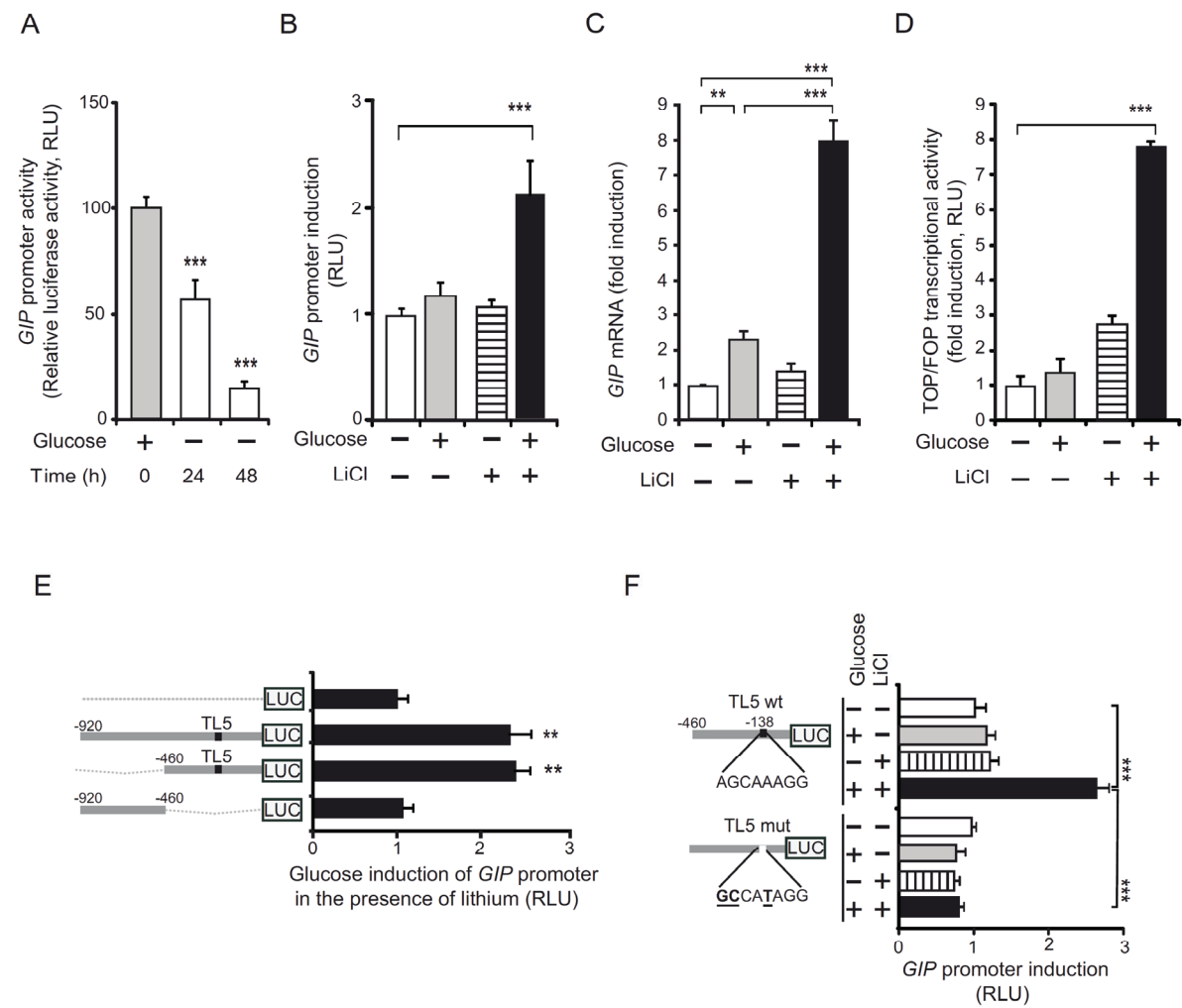




Fig 2

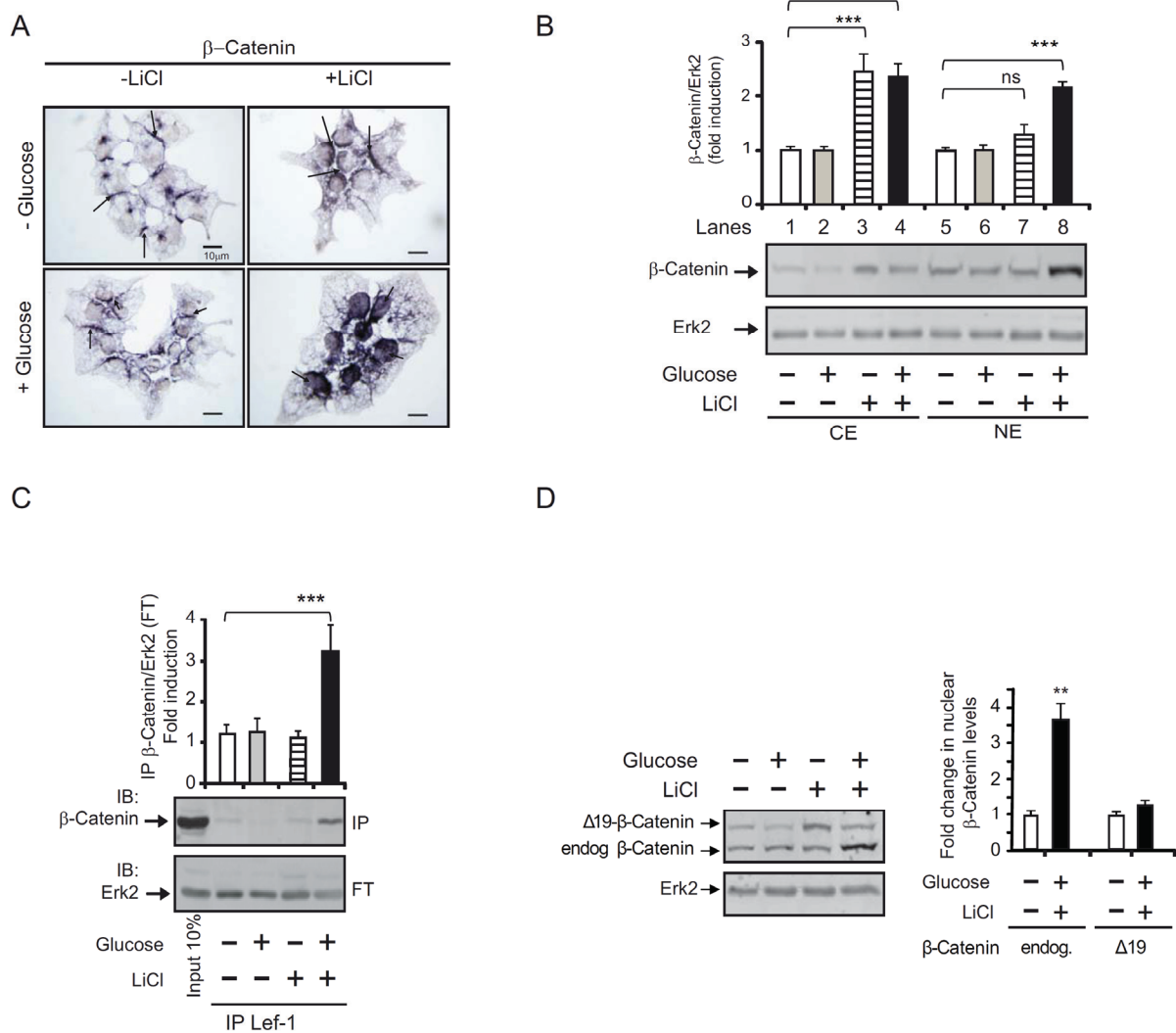


Fig 3.

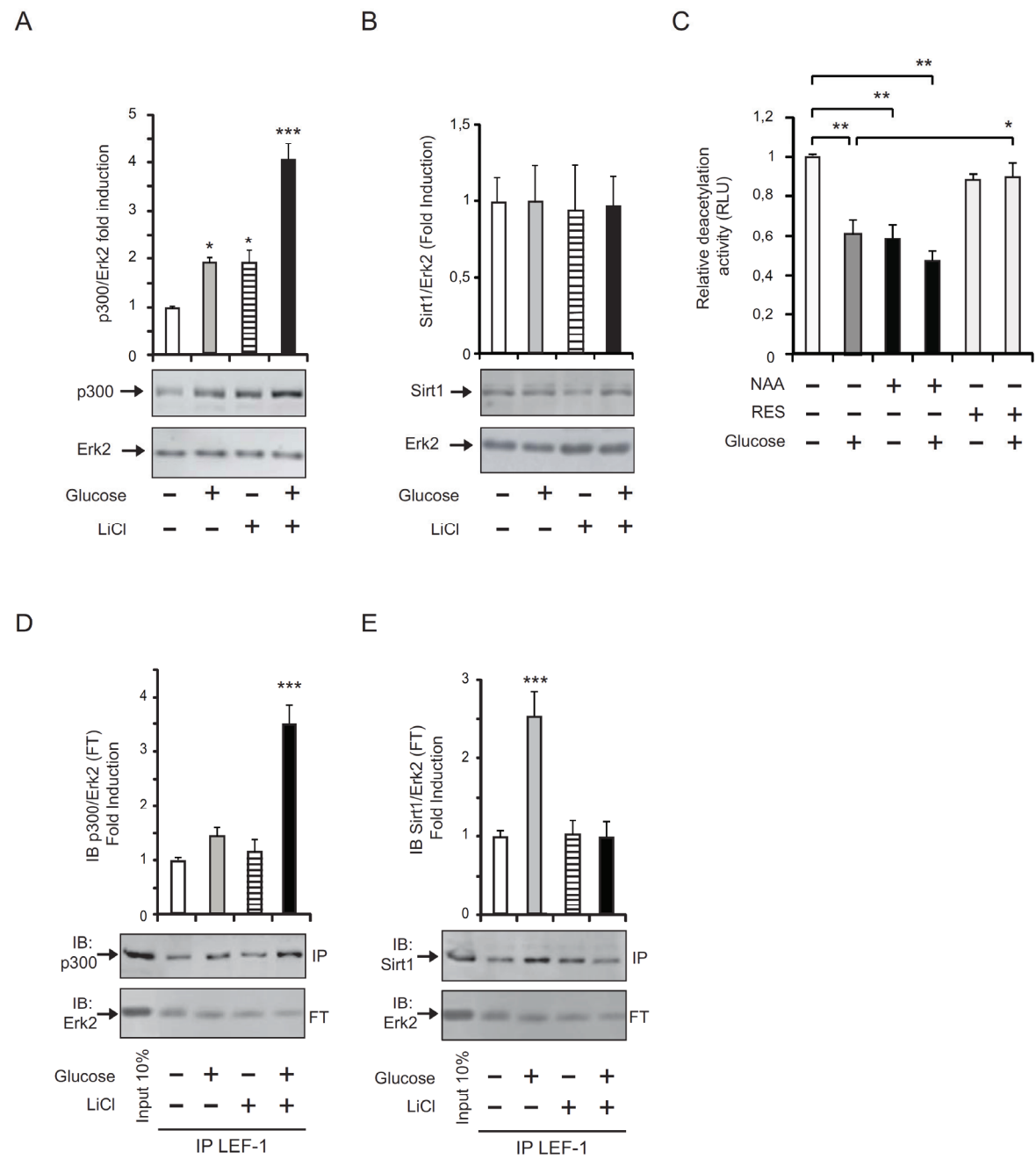


Fig. 4

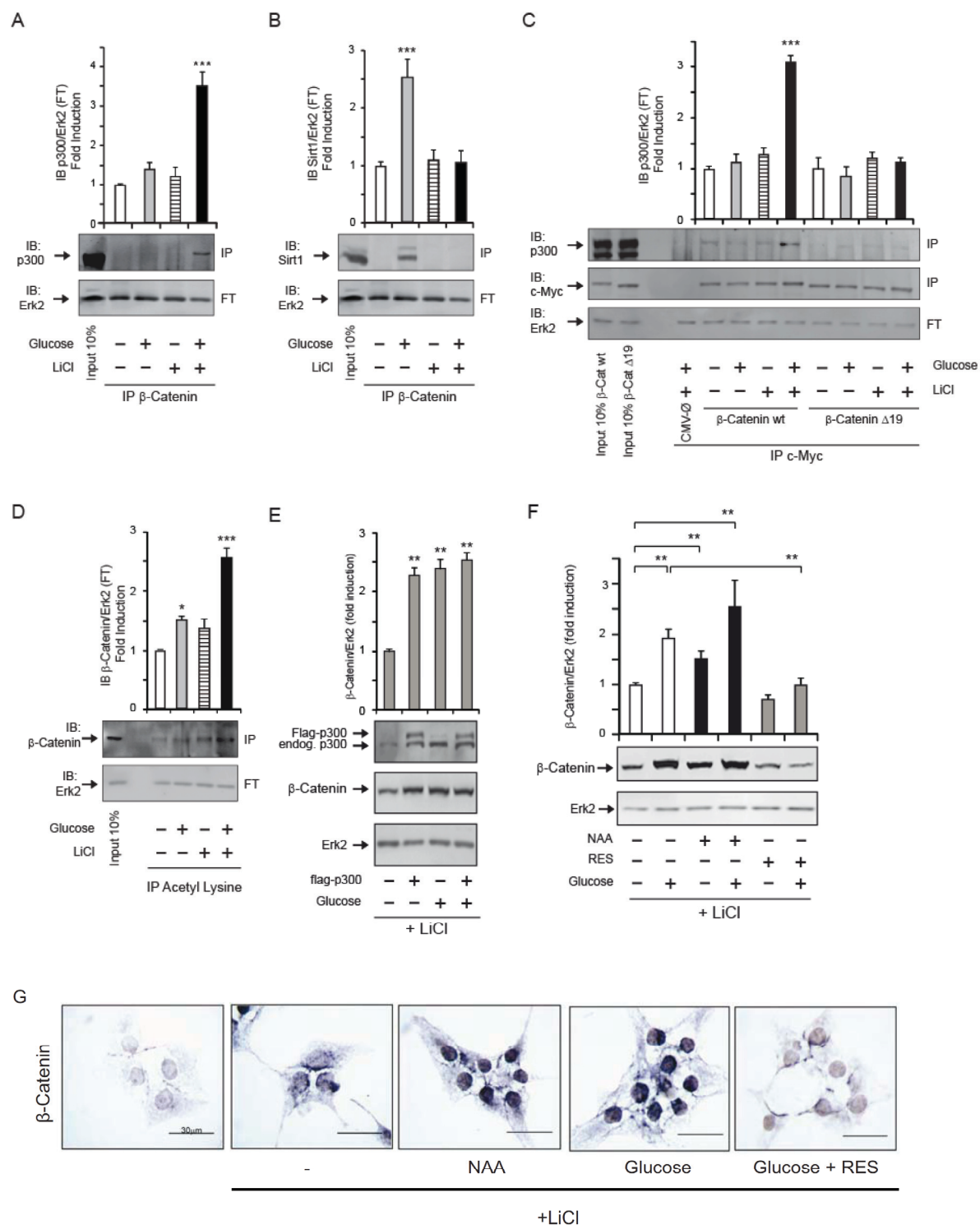


Fig 5

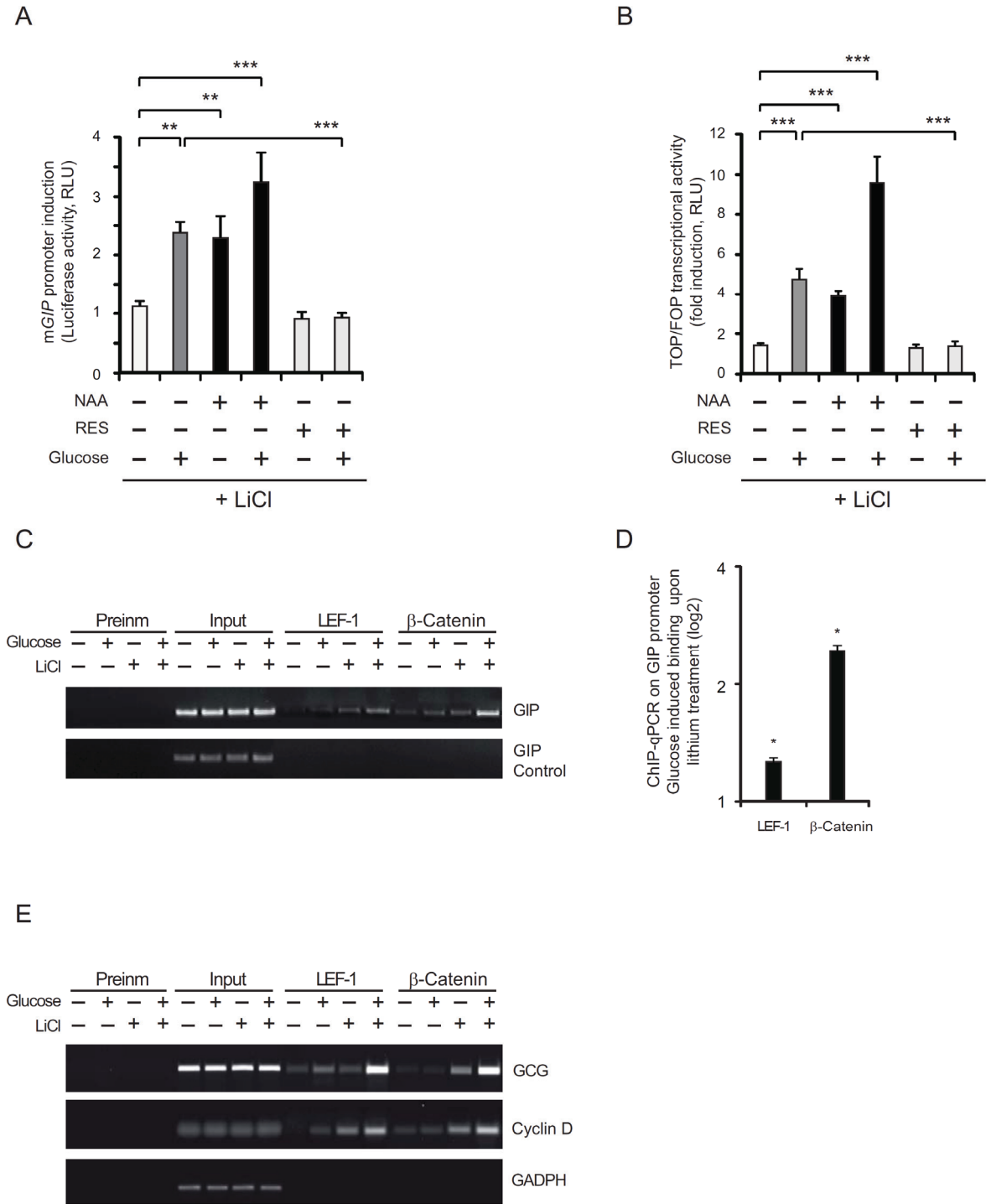
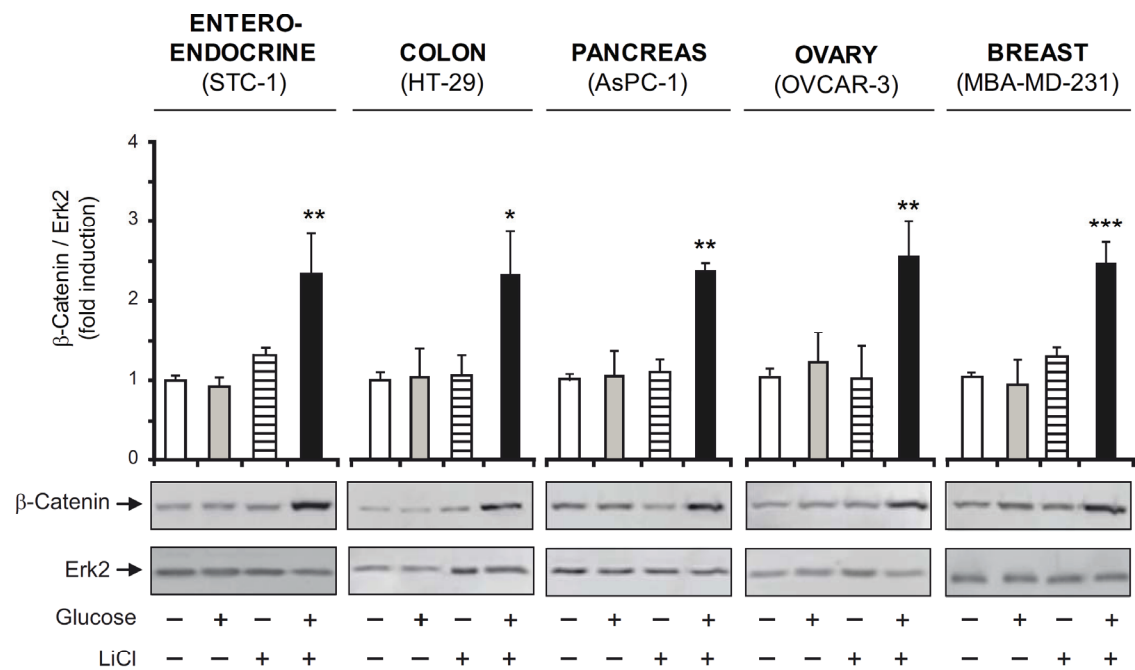
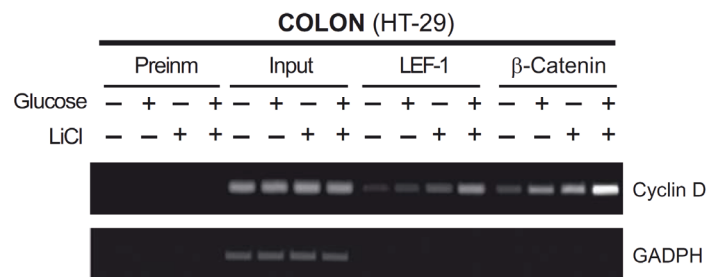


Fig 6

A



B

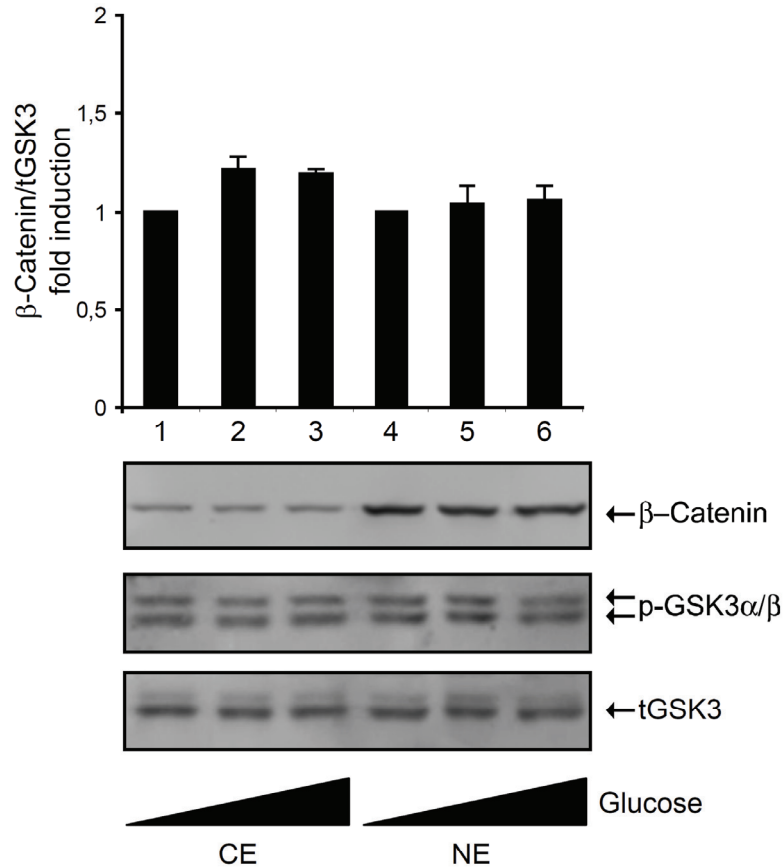


**Inventory of Supplemental Information**

**SUPPLEMENTARY MATERIAL:**

1. Supplementary Figure 1, related to main Figure 2.
2. Supplementary Table 1, related to Experimental Procedures and specifying primers used through this work.

## Figure Supplementary 1



**Supplementary Figure 1. Glucose does not modify the levels of key Wnt signaling intermediaries.** Western-blot analysis of cytoplasmic (CE) or nuclear (NE) extracts from STC-1 cells. Cells were depleted of glucose for 36 h and glucose 5 mM or 25 mM was added for 24h before harvesting. Glucose does not change the levels of GSK3β (total or phospho-Ser9, inactive form) nor of β-catenin. Values were normalized with the loading control (tGSK3) and are referred as fold induction over those of untreated control cells. Values represent mean±SEM; n=3. No significant differences were found by ANOVA test.

**Supplementary Table I: Primers used through out this work.**

PRIMER NAME	USED FOR	SEQUENCE
TL5 MUT F	mutagenesis	5' GCACAGCCCAGG <u>gc</u> CA <u>t</u> AGGGGAAAGTGATTAGGTG 3'
TL5 MUT R	mutagenesis	5'TCACTTTCCCCT <u>a</u> TG <u>gc</u> CCTGGGCTGTGCTAATGGG 3'
RT GIP F	qRT/PCR	5' GAAGAGGTTGAGTTCCGATCC 3'
RT GIP R	qRT/PCR	5' CCATGGCGATGCTGTAATCAC 3'
18s ribos Control F	qRT/PCR	5' AGTCCCTGCCCTTTGTACACA 3'
18s ribos Control R	qRT/PCR	5' GCCTCACTAAACCATCCAATCG 3'
cyclinDProWnt siteF	sqPCR on ChIP	5'-CCTCCCCCTTTTCTCTGCCC-3'
cyclinDProWnt siteR	sqPCR on ChIP	5'-CCTCTGGAGGCTGCAGGACTTTGC-3'
GAPDH control F	sqPCR on ChIP	5'-GGGGTTGCTGTGCTCACTACCG-3'
GAPDH control R	sqPCR on ChIP	5'-CAGAGACCTGAATGCTGCTTCC-3'

Supplementary Table I: Primers used through this work. F: forwards, R: reverse. Underlined letters specify mutated bases.



## *Discusión*



En este trabajo demostramos en primer lugar que la señalización por la vía de WNT induce la producción de las incretinas a nivel de su expresión génica e identificamos los mecanismos y efectores implicados. En el segundo trabajo demostramos que el inductor más conocido de la secreción de las incretinas, la glucosa, depende de la presencia de señales WNT para inducir su expresión. La glucosa amplifica la señalización de WNT modificando profundamente el balance de acetilación de los efectores de WNT y con ello su distribución subcelular y actividad transcripcional. Estas modificaciones afectan a los genes diana de WNT más allá de las incretinas como el de la ciclina D, crítica para la proliferación tumoral. Finalmente, demostramos que la amplificación gluco-dependiente de la señalización de WNT es una regla que se cumple en células tumorales humanas de los más diversos orígenes, subrayando la relevancia de nuestros hallazgos en cáncer.

## **1. Mecanismo de regulación de la expresión de las incretinas GIP y GLP-1 por WNT3A o litio**

En este trabajo diseccionamos el mecanismo por el que las proteínas WNT3A inducen la expresión de las incretinas en células enteroendocrinas de ratón STC-1. El paso crítico en dicha inducción es la inhibición de la glucógeno sintasa quinasa  $3\beta$  (GSK3 $\beta$ ) mediante su fosforilación en la Ser9, que conduce a la acumulación de la  $\beta$ -catenina, efector final de la vía de WNT. La  $\beta$ -catenina acumulada se une a los factores TCF/LEF en los promotores de las incretinas desplazando a los co-represores y convirtiéndolos en potentes activadores transcripcionales de estos genes.

### **1.1. Las proteínas WNT3A se unen a sus receptores e inhiben a la GSK3 $\beta$ en las células enteroendocrinas**

Las proteínas WNT3A en otros sistemas activan la vía canónica mediante la inhibición de la GSK3 $\beta$ , responsable de la subsiguiente degradación de la  $\beta$ -catenina. Dada la complejidad y la inestabilidad de las proteínas WNT a menudo se emplean agentes alternativos, como el litio, para imitar la señalización por WNT puesto que también inactiva a la GSK3 $\beta$ . El litio inactiva a la GSK3 $\beta$  a dos niveles: un mecanismo directo de inhibición competitiva con el  $Mg^{2+}$  que suprime su actividad catalítica dependiente de ATP- $Mg^{2+}$  (184) y una inhibición indirecta induciendo la fosforilación de la GSK3 $\beta$  en la Ser-9 (62, 83) por mecanismos que pueden ir desde la activación de la PKA, la fosfatidilinositol 3'-quinasa/proteína quinasa B (PI3K/PKB), los sustratos de la proteína quinasa C (PKC) (29) e incluso la autorregulación de la propia GSK3 $\beta$  (251).

En nuestro sistema el litio imita a la señalización por WNT3A e inhibe a la GSK3 $\beta$  provocando su fosforilación en la Ser9. Puesto que el litio modifica las actividades de otras quinasas como la PKC (123) y las quinasas activadas por mitógenos o MAPK: MEK/ERK/Rsk (157), JNK (248) y p38 (122), descartamos una acción a través de estas otras vías porque la expresión exógena de una versión inactiva de la GSK3 $\beta$  (K85R), incapaz de unir ATP (140), reproduce exactamente los efectos del litio y de las proteínas WNT3A sobre la transcripción de GIP. En conclusión, los efectos de las proteínas WNT3A sobre la expresión de las incretinas se ejercen a través de la inhibición de la GSK3 $\beta$  y se imitan con el litio.

### 1.2 La inhibición de la GSK3 $\beta$ por señales WNT conduce a la estabilización de la $\beta$ -catenina

Al ser la GSK3 $\beta$  un enzima pleiotrópica que fosforila un gran número de efectores transcripcionales, su inhibición (por litio o proteínas WNT3A) podría inducir la expresión de los genes de las incretinas a través de diversos factores. Algunos ejemplos de los factores de transcripción regulados por la GSK3 $\beta$  son: c-Myc (55), CREB (56), NF-KB (65) o PDX1 (72). Este último factor también regula la expresión de GIP (79). Sin embargo en nuestro modelo, la inhibición de la GSK3 $\beta$  por proteínas WNT3A o litio, responsable de la inducción de los genes de las incretinas, promueve la acumulación de la  $\beta$ -catenina, siendo ésta la responsable de la activación transcripcional de los genes de las incretinas puesto que la expresión exógena de altos niveles de la  $\beta$ -catenina reproduce los efectos de las proteínas WNT3A sobre la expresión de las incretinas, lo que nos permite descartar otros efectores.

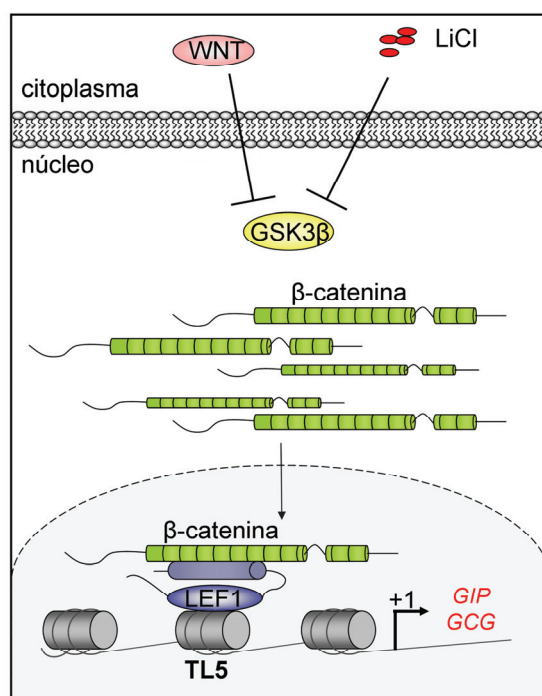
### 1.3 La $\beta$ -catenina actúa a través de los factores TCF/LEF para inducir la expresión de las incretinas

La  $\beta$ -catenina acumulada puede servir como co-factor no solo para los factores de transcripción de la familia TCF/LEF sino también para otros factores como FoxO1 (44) o Mitf (189). Los estudios de actividad transcripcional con los fragmentos del promotor por ensayos de luciferasa tras delecciones sucesivas o mutagénesis dirigida demuestran que los efectos de la  $\beta$ -catenina en los promotores de las incretinas están mediados a través de los factores TCF/LEF.

Tras el clonaje de los promotores de ratón la secuencia funcional se definió mediante ensayos de luciferasa en respuesta a señales de WNT usando delecciones sucesivas basadas en la identificación *in silico* de múltiples sitios teóricos de unión para factores TCF/LEF en

dichos promotores. Nuestros resultados demuestran que el sitio al que denominamos TL5 es reconocido por factores TCF/LEF presentes en las células STC-1 y es el mayor responsable de la inducción del promotor de *GIP* por proteínas WNT3A y litio. El alto grado de conservación del sitio entre distintas especies (rata, ratón y humano) y en los promotores de las dos incretinas (*GIP* y *GCG*) sugieren la existencia de similitudes arquitectónicas que pueden ser determinantes para el control de la expresión de estos genes.

Por tanto, la vía de WNT/ $\beta$ -catenina induce la producción de las incretinas *GIP* y *GLP-1* en células enteroendocrinas STC-1 de ratón, mediante la inhibición de la GSK3 $\beta$  con la consiguiente acumulación de la  $\beta$ -catenina y su unión a los factores TCF/LEF en el sitio TL5 situado en el promotor proximal de *GIP* o su equivalente en el promotor de *GCG*, como se representa en la [figura 14](#).



**Figura 14:** Regulación de la expresión de *GIP* y *GCG* por la vía de WNT.

En trabajos previos Jin *et al.* habían usado una construcción quimera del elemento regulador G2 (-192 a -179 pares de bases) del promotor de *GCG* de rata fusionado a un promotor mínimo de la timidina quinasa (148). Los efectos transcripcionales del litio sobre la expresión de este promotor quimérico de *GCG* se estudiaron en células GLUTag derivadas de tumores intestinales y modificadas para expresar el gen de *GCG* (40). Nuestro trabajo extiende sus resultados a las proteínas WNT3A y a los promotores naturales de *GIP* y *GCG* de ratón, identifica un elemento equivalente en el promotor humano y además disecciona los detalles moleculares en un contexto de células alternativas (STC-1).

El litio se usa como terapia en psiquiatría y nosotros demostramos que es un potente inductor de la expresión de las incretinas, cuyas acciones extrapancreáticas están solo empezando a conocerse. Este hecho junto con la observación de que los pacientes psiquiátricos tratados con litio (síndrome bipolar y otros), como estabilizador del ánimo, presentan frecuencias aumentadas de trastornos metabólicos como aumento de peso, obesidad y/o desarrollo de diabetes tipo 2 (91), nos empuja a especular que tales efectos podrían estar mediados por el aumento de la producción de las incretinas, concretamente por GIP, inducido por el litio. Aunque sabemos que el litio puede ejercer sus efectos a través de otras vías, como explicamos en esta discusión, consideramos que el análisis de los niveles plasmáticos de GIP y su respuesta al tratamiento con el litio en estos pacientes representa una interesante línea de investigación futura. Si el aumento de la obesidad y otras complicaciones metabólicas de graves consecuencias están mediados por GIP, su producción, secreción y señalización podrían ofrecer nuevas oportunidades de mejora del tratamiento.

Puesto que las incretinas ejercen un control global del metabolismo y los estudios epidemiológicos indican una implicación de la vía de WNT en el control metabólico, nuestro trabajo sugiere que las incretinas pueden mediar las acciones de WNT sobre el metabolismo global, estableciendo un nuevo vínculo WNT/incretinas/metabolismo. En consonancia con nuestros resultados, el número de publicaciones que relacionan la vía de WNT y el metabolismo se ha multiplicado exponencialmente en los últimos años (35, 113, 183, 190, 195, 231).

El principal inductor de la secreción de las incretinas es la glucosa (159) y cabría esperar que también regule su producción. Puesto que la expresión génica de las incretinas está gobernada por la vía WNT, la pregunta siguiente parecía evidente: ¿La glucosa regula la expresión de las incretinas? Y si es así. ¿la presencia de glucosa modula la regulación de las incretinas por la vía de WNT?

## **2. Regulación de la vía de WNT por la glucosa**

Usando el litio como imitador de la señalización de WNT, estudiamos el efecto de la glucosa en un ambiente sin o con señalización de WNT. Nuestros resultados demuestran que la glucosa potencia la expresión de las incretinas inducida por la vía de WNT. Mas aún, los efectos de la glucosa sobre la expresión de las incretinas se ejercen a través de la  $\beta$ -catenina, un intermediario acumulado en el citoplasma tras la estimulación con las proteínas WNT3A o

el litio. Por tanto, la señalización de WNT tiene un efecto permisivo para la glucosa, cuyos efectos no se observan en ausencia de la señalización de WNT.

La aparente insensibilidad a la glucosa que muestran muchos cultivos primarios intestinales podría por tanto atribuirse a la ausencia de una señal facilitadora o permisiva como la de WNT. Así, aunque la liberación del GLP-1 inducida por la glucosa ha sido bien documentada *in vivo* e *in vitro* (63), los cultivos primarios intestinales murinos y caninos (36) no parecen responder a la glucosa, lo que ha llevado a dudar a cerca de si las células L son sensibles a la glucosa y lo mismo ha sucedido en la línea celular STC-1.

La línea celular STC-1 y los genes de las incretinas representan un modelo óptimo para estudiar la modulación ejercida por la glucosa sobre el control transcripcional ejercido por WNT por varias razones. En primer lugar porque el tipo celular enteroendocrino es exquisitamente sensible a la glucosa en condiciones fisiológicas; las células enteroendocrinas son las primeras que detectan la glucosa ingerida y responden a ésta secretando incretinas, necesarias para la normal secreción gluco-dependiente de insulina. Si la glucosa es uno de los principales inductores de la secreción de las incretinas (159), cabe esperar que también regule su producción por las células enteroendocrinas como las STC-1. En segundo lugar y como se explicó en la introducción, las células STC-1 son el único sistema *in vitro* capaz de producir y secretar GIP y GLP-1. En tercer lugar, disponemos de una caracterización detallada previa de los elementos de los promotores de las incretinas y los efectores implicados en la regulación de su expresión por las proteínas de WNT. En cuarto lugar, las células STC-1 tienen un origen tumoral y dada la importancia de la vía de WNT en cáncer, estas células nos permitirían extender nuestras conclusiones a la señalización implicada en cáncer. Por todas estas razones hemos usado las células STC-1 y el promotor de *GIP* como el modelo más sensible para analizar los mecanismos subyacentes a la modulación de la señalización de WNT por la glucosa.

Nuestro trabajo demuestra por primera vez que la glucosa aumenta la producción de las incretinas en células enteroendocrinas STC-1, pero que se necesita la señalización por WNT para poder observar dicha respuesta.

## 2.1. La glucosa requiere la co-señalización con WNT para inducir la expresión de la incretina GIP

Los efectos transcripcionales de la glucosa son extremadamente variados debido a que activa múltiples vías de señalización que a su vez modifican distintos factores de

transcripción que actúan sobre múltiples promotores (73, 139, 211). En otros sistemas la glucosa regula la actividad de factores de transcripción como USF (106), ChREBP (73), FoxO1 (126) o PDX1 (121), por citar algunos que tienen sitios de unión teóricos en el promotor de *GIP* (ACC y CGJ, datos no publicados) y que podrían mediar la inducción por glucosa. Nuestros resultados indican que la glucosa es capaz de amplificar la señalización de WNT a través de sus efectores ya que una construcción artificial que sólo lleva elementos TCF/LEF (TOPFlash) responde de forma sinérgica a la glucosa y el litio. El promotor de *GIP* responde de la misma manera y esta respuesta depende de la integridad del sitio TL5 identificado en el trabajo previo como responsable de la inducción por las proteínas WNT3A o el litio. Por tanto, los efectos transcripcionales de la glucosa sobre *GIP* están mediados por efectores de WNT.

## 2.2. Las dianas transcripcionales de la glucosa son los efectores de la vía de WNT: LEF1 y $\beta$ -catenina

Basándonos en el trabajo anterior analizamos sistemáticamente la influencia de la glucosa sobre los intermediarios críticos en la señalización por WNT para inducir la expresión de las incretinas. En primer lugar, descartamos que la glucosa ejerza sus efectos actuando sobre la GSK3 $\beta$  pues no modifica sus niveles, ni su fosforilación, su actividad o su localización. Nuestro trabajo muestra que el litio y la glucosa favorecen la formación de los complejos LEF1/ $\beta$ -catenina, por lo que la glucosa podría estar modificando los niveles o la afinidad de la  $\beta$ -catenina por los distintos factores TCF/LEF. Aunque los factores de transcripción TCF/LEF interaccionan con la  $\beta$ -catenina a través del mismo dominio, los trabajos realizados por Waterman y colaboradores han descrito que las células normales y cancerosas presentan cantidades relativas distintas de las isoformas de los factores TCF/LEF y que la alteración en las proporciones es decisiva para la activación de los genes diana implicados en la diferenciación y en la progresión tumoral (229). En este contexto, nuestro trabajo demuestra que la glucosa no altera la expresión de LEF1 o de TCF7L2 en las células STC-1 (ACC y CGJ, datos no mostrados), por lo que el aumento en la interacción de LEF1 y la  $\beta$ -catenina podría deberse a modificaciones postraduccionales bien en el factor LEF o en la  $\beta$ -catenina, que se estudiarán con más detalle en el futuro.



### 2.3 La glucosa altera la distribución subcelular de los efectores de WNT: LEF1 y $\beta$ -catenina

Puesto que la glucosa no altera los niveles de los efectores clave de WNT implicados en la inducción de GIP (LEF1 y  $\beta$ -catenina) analizamos cambios en la distribución subcelular de los mismos. La glucosa, además de promover la formación de los complejos LEF1/ $\beta$ -catenina, favorece la acumulación nuclear de los mismos y sus efectos transcripcionales, un dato a tener en cuenta en el diseño de posibles terapias antitumorales dirigidas a la señalización de WNT. La re-distribución subcelular de factores de transcripción parece ser un mecanismo general promovido por la glucosa que también estimula la translocación del citoplasma al núcleo del factor de transcripción PDX1 (121) y la salida del núcleo al citoplasma de FoxO1 (126).

Por otra parte, el tráfico núcleo-citoplasma aparece como un importante mecanismo de regulación general de los componentes de la vía de WNT y nuestros resultados indican que este transporte está siendo regulado por la glucosa. Nuestro trabajo no sólo suma otro factor de transcripción (LEF1) a la larga lista de objetivos transcripcionales de la glucosa, sino que aporta también un co-factor (la  $\beta$ -catenina) de interés general en la renovación de los tejidos y la oncogénesis (192). Hasta la fecha no se había descrito el tráfico de co-factores en respuesta a la glucosa. Dado que no se conoce una secuencia de unión al DNA de la  $\beta$ -catenina y que actúa como co-factor de otros factores de transcripción distintos a TCF/LEF, como FoxO1 (44) o Mitf (189) que a su vez regulan múltiples genes, la re-distribución de la  $\beta$ -catenina por la glucosa resulta de gran importancia.

### 2.4. La glucosa favorece la retención nuclear de los efectores de WNT y no su entrada al núcleo

La acumulación nuclear de la  $\beta$ -catenina podría deberse al aumento de la entrada o a la inhibición de su salida. Como se expuso en la introducción, a pesar del gran número de estudios realizados no está claro el mecanismo por el que la  $\beta$ -catenina pasa al núcleo. Dado que la  $\beta$ -catenina no tiene señal de localización nuclear ni señal de exporte nuclear (se ha sugerido que la  $\beta$ -catenina podría estar entrando al núcleo gracias a sus repeticiones Arm (similares a las presentes en las importinas) (98). Sin embargo, varios trabajos han descrito que la translocación nuclear de la  $\beta$ -catenina es dependiente del factor de transcripción LEF1 ya que su localización nuclear es estimulada por la expresión exógena de los factores LEF1 (71). Nuestros resultados muestran que la glucosa también promueve la redistribución subcelular de LEF1 endógeno, pero no de TCF7L2 (que permanece siempre en el núcleo,

datos no mostrados) por lo que podría ser LEF1, gracias a la unión de su secuencia NLS a la importina- $\alpha$ , el que media el paso de la  $\beta$ -catenina al núcleo. Sin embargo, LEF1 no es esencial para la entrada de la  $\beta$ -catenina al núcleo, ya que una forma mutada de la  $\beta$ -catenina que no interacciona con LEF1 ( $\Delta 19$ - $\beta$ -catenina) (156) entra al núcleo pero no es eficazmente retenida. En células STC-1 la secuencia NLS de LEF1 es necesaria para su acumulación nuclear, ya que la mutación de esta secuencia produce la falta de redistribución de LEF1 (ACC y CGJ, datos no mostrados). Además, la sobre-expresión de LEF1 silvestre arrastra a la  $\beta$ -catenina al núcleo de modo independiente de estímulo (ACC y CGJ, datos no mostrados) sugiriendo que la interacción de LEF1/ $\beta$ -catenina puede ser limitante en la entrada. Sin embargo no es el mecanismo afectado por la glucosa porque la  $\Delta 19$ - $\beta$ -catenina entra al núcleo en las células STC-1, entrada que ha de ser independiente de LEF1. El hecho de que este mutante de la  $\beta$ -catenina no se retenga eficientemente en el núcleo indica que la interacción con LEF1 promovida por la glucosa es crítica para dicha retención. Por tanto, concluimos que la re-distribución de LEF1/ $\beta$ -catenina en respuesta a la glucosa y la señalización de WNT o del litio se basa en su capacidad de interactuar entre sí y el mecanismo afectado es su retención nuclear.

#### 2.5. El balance acetilación/desacetilación es el responsable de la retención nuclear de los efectores de WNT promovida por la glucosa

Se han descrito muchas proteínas que modulan la retención y que podrían mediar el efecto de la glucosa. Por ejemplo, un intermediario de WNT, APC evita la exportación nuclear de la  $\beta$ -catenina por CRM1 (exportin1/Xpo1) (147). Otra posibilidad es que la glucosa esté induciendo modificaciones postraduccionales en las proteínas efectoras que controlan la expresión de los genes diana de la vía de WNT. Varios estudios han descrito la regulación de los niveles de la p300 por la glucosa (33) y se ha demostrado que la p300 interacciona y acetila distintos residuos de la  $\beta$ -catenina (K49, K312, K345, K435) (19, 108, 237, 241) aumentando su unión a los factores TCF/LEF. La acetilación de la  $\beta$ -catenina por p300/CBP aumenta su potencial oncogénico al aumentar su actividad transcripcional y la expresión de sus genes diana, tales como la ciclina D y c-myc (59, 194, 207). En consonancia con esto, nuestros resultados muestran que la glucosa aumenta los niveles de la p300 por si sola, aunque no es capaz de inducir su interacción con la  $\beta$ -catenina ni promover la retención nuclear de ésta. Sin embargo en presencia de la señalización de WNT o de litio, la glucosa favorece la unión de la p300 a LEF1 y a la  $\beta$ -catenina sugiriendo la necesidad de una acumulación previa de la  $\beta$ -catenina por WNT o litio y la formación de un complejo previo

LEF1/ $\beta$ -catenina. El hecho de que el mutante  $\Delta 19$ - $\beta$ -catenina, incapaz de unirse a LEF1, no interaccione con p300 y no se acumule en el núcleo confirma que LEF1 estabiliza la interacción de la  $\beta$ -catenina con p300. La interacción de la  $\beta$ -catenina con LEF1 y con la p300 es necesaria para su retención nuclear. Si la p300 es un factor limitante en el proceso de acumulación nuclear de la  $\beta$ -catenina, la expresión exógena de altos niveles de p300 aumentaría sus posibilidades de interacción con la  $\beta$ -catenina. En efecto, en un ambiente con litio (que aumenta las moléculas de la  $\beta$ -catenina en el citoplasma), la expresión exógena de la p300 elimina la necesidad de glucosa para inducir la acumulación nuclear de la  $\beta$ -catenina. En conclusión, la glucosa induce la acetilación de la  $\beta$ -catenina por la p300 y su retención nuclear en presencia de señales de WNT.

Hasta la fecha solo se ha sugerido un papel negativo para la interacción directa entre la p300 y TCF7L2 tanto en mamíferos (109) como en *Drosophila* (222) y no sabemos cual es el significado de la interacción basal entre LEF1 y la p300 que nosotros detectamos en todas las condiciones. En cualquier caso los aumentos en la p300 pueden conducir tanto a la activación (61) como a la represión (109) de la señalización de WNT y se necesitan más estudios para determinar dónde está la diferencia.

El hecho de que la acetilación de la  $\beta$ -catenina y su interacción con la p300 potencien su actividad transcripcional en los genes diana de WNT implicados en cáncer, ha hecho pensar que las desacetilasas que opongan su efecto a la p300 se podrían usar como terapia contra el cáncer (22, 77). Distintos inhibidores de las desacetilasas de histonas (HDAC) de clase I y II están en fases avanzadas de ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer (125), pero los tratamientos de tumorigénesis y de otras enfermedades asociadas a la edad se están centrando en las HDAC de clase III o las sirtuinas (SIRT) (104). La más conocida es la sirtuina 1 (SIRT1), una desacetilasa dependiente de  $\text{NAD}^+$  (Nicotinamida adenina dinucleótido) que desacetila histonas y también sustratos que no son histonas (18). La actividad de la SIRT1 aumenta en la restricción calórica y se ha propuesto que tiene función de supresor tumoral ya que regula el potencial oncogénico de la  $\beta$ -catenina (47). En este contexto, nuestros resultados indican que las interacciones y la actividad de la SIRT1 antagonizan la acción de la p300 sobre los efectores de la vía de WNT. Aunque los niveles de la SIRT1 no varían en función del tratamiento, la actividad de las sirtuinas disminuye en presencia de la glucosa y el litio. De forma similar, las interacciones de la SIRT1 con LEF1 y la  $\beta$ -catenina están favorecidas por la glucosa en ausencia de litio pero se rompen en presencia de éste. Las condiciones que favorecen la interacción entre la SIRT1 y la  $\beta$ -catenina correlacionan con su localización extra

nuclear también en nuestro sistema y las que se oponen a dicha interacción, como el tratamiento combinado con la glucosa y el litio permiten la retención nuclear de la  $\beta$ -catenina.

Varios trabajos han descrito que la restricción calórica y el resveratrol (RES), un polifenol con efecto anticancerígeno que se encuentra en las frutas (25), aumentan la actividad de la SIRT1 disminuyendo los niveles de la  $\beta$ -catenina acetilada y reduciendo su capacidad oncogénica (19, 47), adjudicando un papel relevante como supresor tumoral a la SIRT1 en el origen de cáncer de colon (47, 171). Nuestros resultados indican que al potenciar la actividad de las sirtuinas con RES se bloquea eficazmente la retención nuclear de la  $\beta$ -catenina y la transcripción de los genes diana de WNT en respuesta al litio y a la glucosa. Por el contrario la nicotinamida (NAA) que inhibe la actividad desacetilasa de las sirtuinas, favorece la retención nuclear de la  $\beta$ -catenina aumentando su actividad transcripcional e imitando los efectos de la glucosa. Estos resultados confirman que la glucosa ejerce su función, en parte, a través de las sirtuinas.

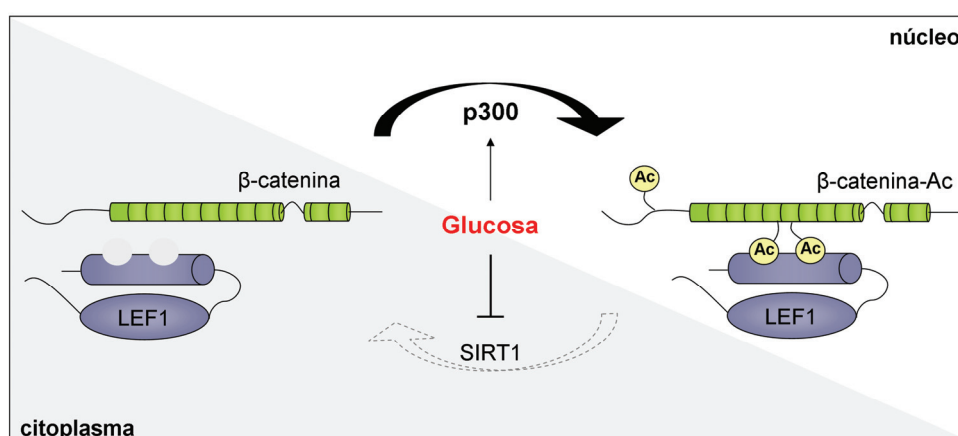
Por tanto, nuestros resultados indican que la glucosa está regulando la vía de WNT a través del control del balance acetilación/desacetilación (p300/SIRT1) de la  $\beta$ -catenina que altera su localización subcelular y su actividad transcripcional sobre los genes diana de la vía de WNT. La glucosa aumenta los niveles e interacciones de la acetil transferasa p300 con la  $\beta$ -catenina y disminuye la actividad desacetilasa de las sirtuinas.

Es importante destacar que el tratamiento con solo litio aumenta los niveles de la p300 y de la  $\beta$ -catenina y disminuye la actividad de las sirtuinas, pero no conduce a una retención nuclear de la  $\beta$ -catenina. Los aumentos de la p300 por si solos podrían desplazar el balance hacia la acetilación pero su insuficiencia para retener a la  $\beta$ -catenina en el núcleo indica que sin glucosa no hay complejo LEF1/ $\beta$ -catenina que estabilice las interacciones con la p300. Por tanto aunque los niveles de la p300 estén ligeramente aumentados no es suficiente para promover una acetilación de la  $\beta$ -catenina almacenada en el citoplasma. Por otra parte el tratamiento solo con la glucosa también aumenta los niveles de la p300 sin alterar la actividad de las sirtuinas, lo que desplazaría el balance hacia las acetilaciones también, pero en esta situación la poca  $\beta$ -catenina soluble está fuertemente asociada con la SIRT1 lo que podría impedirle su interacción con LEF1 (por falta de acetilación) y su retención nuclear.

La hiperacetilación de la histona H4 debido a la estimulación de la p300 por la glucosa induce la expresión de genes como el de la *insulina* (138). Se sabe que la acetilación de los residuos de lisina de las histonas H3 y H4 conducen al aumento o la disminución en la

accesibilidad de la maquinaria de transcripción y por ende a la represión o activación de la expresión génica (117). Con nuestros datos no podemos descartar efectos adicionales de la glucosa alterando el empaquetamiento de la cromatina, a nivel de los genes que aquí estudiamos (*GIP*, *GCG* y *Ciclina D*), ejerciendo modificaciones postraduccionales en las histonas por ejemplo a través de la p300, al igual que se ha descrito para otros genes. Futuros trabajos indicarán si la glucosa está regulando la expresión de los genes diana de WNT también a través de la remodelación de la cromatina.

El modelo que se presenta en la [figura 15](#), resume nuestros resultados en el contexto de los conocimientos previos sobre los efectos de las acetilaciones por la p300 y las desacetilaciones por la SIRT1 sobre la retención nuclear de la  $\beta$ -catenina. La alta concentración de glucosa aumenta la acetilación de la  $\beta$ -catenina (acumulada en respuesta a WNT o litio) a través del aumento de los niveles y de la interacción con la p300 y la disminución de la interacción y la actividad de la SIRT1. Como resultado la p300, LEF1 y la  $\beta$ -catenina acetilada se retienen en el núcleo aumentando la transcripción de sus genes diana.



**Figura 15:** Papel de la glucosa en la señalización por WNT.

En conjunto, nuestros datos proporcionan un mecanismo de cómo el elevado consumo de glucosa por las células tumorales puede facilitar y mantener el fenotipo tumoral, promoviendo la retención nuclear de los efectores de WNT: LEF1 y  $\beta$ -catenina, a través de la profunda alteración del balance de acetilaciones ejercidas sobre dichos efectores por acetil transferasas como la p300 y desacetilasas como la SIRT1. La regulación de la actividad de las sirtuinas por la glucosa en presencia de litio resulta especialmente interesante dada su importancia en el desarrollo de dianas antitumorales.

Los niveles intracelulares del  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  podrían considerarse un sensor metabólico de la célula, de forma que la ausencia de nutrientes como fuente de energía, el consumo

elevado de energía o la hipoxia, reducen los niveles de ATP y aumenta la relación  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ . El aumento de  $\text{NAD}^+$ , cofactor de las sirtuinas, podría facilitar su actividad para disminuir la señalización proliferativa de WNT (tumorigénesis) en momentos de poca disponibilidad energética. En las células tumorales, con un elevado consumo de glucosa - efecto Warburg- el NADH producido en la glucólisis se oxida a  $\text{NAD}^+$  durante la reducción del piruvato a lactato, sin embargo este  $\text{NAD}^+$  ha de ser utilizado nuevamente en la glucólisis; la falta de co-factor  $\text{NAD}^+$  impediría la actividad de las sirtuinas con lo que se permitiría la acumulación de la  $\beta$ -catenina acetilada en el núcleo, requisito necesario para la proliferación tumoral. Queda mucho por aprender sobre las sirtuinas, su diversidad y su regulación por factores ambientales tan controlables como la dieta o el estilo de vida y futuras investigaciones esclarecerán si potenciar la actividad de las sirtuinas puede ofrecer protección contra enfermedades asociadas con la edad, como el cáncer, debido a su capacidad de suprimir la señalización de WNT/ $\beta$ -catenina.

El mecanismo identificado en este trabajo por el que la glucosa y la señalización de WNT o litio sinergizan para promover la acumulación nuclear y la actividad transcripcional de los efectores de WNT no se restringe a la inducción de los genes de las incretinas, sino que se extiende a genes implicados en la proliferación celular como la ciclina D. Su relevancia en cáncer queda probada por el hecho de que nuestros resultados se extienden a una gran variedad de líneas celulares derivadas de tumores humanos de diversos orígenes como colon (HT-29), páncreas (AsPC-1), ovario (OVCAR3) y mama (MDA-MB-231).

La necesidad de señales de WNT para la inducción de la expresión génica por glucosa y el efecto diferencial del tratamiento combinado en la acumulación de LEF1/ $\beta$ -catenina no se habían descrito antes, y es probable que más allá de sus implicaciones en cáncer desempeñen un papel clave en la homeostasis de las células enteroendocrinas modulando la secreción de las incretinas.

### **3. Implicaciones en enfermedades metabólicas y cáncer**

Fisiológicamente, los niveles elevados de glucosa inducen la secreción de las incretinas y de la insulina (basal e inducida por las incretinas); mientras que la disminución de la glucemia por la insulina detiene la secreción de las incretinas y de la insulina. Los fallos en estos mecanismos de retroalimentación negativa conducen a una falta de regulación de la glucemia y al desarrollo de la diabetes y de otras enfermedades metabólicas. Aunque no está claro cómo contribuyen las incretinas a la diabetes, el efecto incretina está disminuido o ausente en la diabetes (219) estableciéndose, con la secreción insuficiente de insulina, un estado de

hiperglucemia que podría contribuir al riesgo incrementado de cáncer (200). Nuestros resultados sobre la regulación de la expresión de las incretinas por las señales de WNT podrían proporcionar un mecanismo adicional a la creciente asociación epidemiológica entre las alteraciones en la señalización de WNT y las enfermedades metabólicas, sobre todo considerando el creciente protagonismo de las incretinas en el control metabólico global.

Por otra parte, las enfermedades metabólicas más frecuentes como la diabetes o la obesidad, llevan asociado un riesgo incrementado de padecer ciertos tipos de cáncer: colon, páncreas, hígado (38, 166, 181). Los aumentos en la frecuencia de cáncer en poblaciones diabéticas se han atribuido clásicamente al descontrol de la señalización por insulina (169). La insulina puede ejercer un efecto mitogénico a través de IGF-1R, que comparte alrededor de un 80% de homología con el receptor de la insulina, pero que ejerce una función mitogénica más potente. La capacidad de IGF-1 para promover el desarrollo de ciertos cánceres epiteliales - mama, colon- (170), ha hecho que se desarrollen terapias basadas en bloquear su función en pacientes con cáncer. No obstante, aunque el aumento de la señalización de insulina/IGFR es probable que desempeñe un papel en el aumento de la frecuencia de cáncer (57), nuestros resultados sugieren que el estado de hiperglucemia y el balance energético podrían señalar en cáncer a través de otros sensores metabólicos.

Los sensores metabólicos como la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y proteína quinasa diana de la rapamicina (mTOR) están adquiriendo una gran relevancia como dianas antitumorales (254). Estudios epidemiológicos recientes han puesto en evidencia que el tratamiento con metformina (una biguanida clásica en el tratamiento de la diabetes que activa a la AMPK) disminuye el riesgo de mortalidad por cáncer en los diabéticos (110). El éxito de esta estrategia ha hecho que se dirijan los esfuerzos al desarrollo de drogas anti-tumorales contra dianas metabólicas (206), así que nuestro estudio no puede estar de mayor actualidad.

Las células tumorales se caracterizan por alteraciones metabólicas entre las que destacan el elevado consumo de glucosa, denominado efecto “Warburg” (227), que es bien conocido en la clínica y que se aprovecha en las técnicas de imagen para el diagnóstico de tumores (178). Nuestros resultados sugieren que los altos niveles de glucosa transportados a las células tumorales contribuyen a perpetuar el fenotipo tumoral asegurando la acumulación nuclear de la  $\beta$ -catenina para activar genes implicados en la proliferación celular.

La vía de WNT es una vía proliferativa necesaria para mantener la homeostasis del epitelio intestinal; los fallos en su regulación están implicados en cáncer y la localización



nuclear de la  $\beta$ -catenina es un marcador de malignidad bien establecido en una amplia gama de tumores (192). En este contexto, nuestros resultados indican que la glucosa puede resultar determinante para la retención nuclear de los complejos LEF1/ $\beta$ -catenina en el núcleo durante la progresión tumoral. Fisiológicamente, la  $\beta$ -catenina debe poder entrar al núcleo puntualmente, activar ciertos genes y ser inmediatamente exportada para su degradación en el citoplasma. En una célula tumoral, la captura masiva de glucosa altera el balance de acetilaciones/desacetilaciones promovidas por la p300 y las sirtuinas y favorecería la retención nuclear de la  $\beta$ -catenina acumulada por las señales de WNT.

La glucosa sola no altera la expresión de los genes inducidos por señales de WNT sino que actúa sobre intermediarios acumulados tras la señalización por WNT. Esta necesidad de señalización por WNT previa para que la glucosa ejerza sus efectos sobre los genes diana de WNT subraya la importancia de la secreción autocrina o paracrina de ligandos WNT por parte de las células tumorales (8). Así, en los macrófagos la glucosa es necesaria para promover la activación autocrina de la vía de WNT/ $\beta$ -catenina (4). La identificación de las fuentes y la naturaleza de las señales que estimulan la vía de WNT/ $\beta$ -catenina para cooperar con la glucosa en la progresión tumoral es una cuestión de gran importancia.

La investigación de las señales ambientales y de los mecanismos implicados en la regulación de la vía de WNT, constituye un campo de investigación apasionante especialmente en relación con los factores de la dieta que podrían contribuir a prevenir los efectos de las alteraciones de la vía de WNT en cáncer. A pesar del gran número de estudios epidemiológicos que relacionan las enfermedades metabólicas con el cáncer, apenas existen estudios que proporcionen explicaciones mecanísticas. Nuestro trabajo es pionero en el campo porque: (1) identifica un mecanismo por el que una vía asociada a cáncer, como la vía de WNT regula controladores generales del metabolismo como las incretinas y (2) porque identifica las bases mecanísticas por las que los estados hiperglucémicos pueden contribuir a seleccionar y perpetuar el fenotipo proliferativo de las células tumorales. Por último, el hecho de que los excesos en un nutriente alteren tan profundamente la señalización de la vía de WNT sugiere que otros nutrientes también podrían hacerlo. En definitiva, no está tan lejos de establecer las bases mecanísticas por las que un estilo de vida determinado puede potenciar el riesgo de cáncer. En consecuencia sería posible revertir los aumentos en la frecuencia de cánceres asociados al metabolismo promoviendo un estilo de vida saludable.



## *Conclusiones*



**CONCLUSIONES:**

1. Las proteínas WNT3A y el litio inducen la expresión de las incretinas GIP y GLP-1 en células STC-1 enteroendocrinas de ratón.
2. La inducción de las incretinas por WNT3A o por litio se da a través de la inhibición de la GSK3 $\beta$ , la acumulación de la  $\beta$ -catenina y la unión del complejo LEF1/ $\beta$ -catenina a un elemento de respuesta TCF/LEF funcional conservado en los promotores de *GIP* y *GCG*.
3. La glucosa amplifica la señalización de WNT favoreciendo la formación de los complejos LEF1/ $\beta$ -catenina y la retención nuclear de los mismos.
4. El mecanismo por el cual la glucosa favorece la retención nuclear de la  $\beta$ -catenina implica el balance acetilación/desacetilación a 2 niveles: el aumento de los niveles y la interacción de la acetil transferasa p300 y la disminución de la actividad desacetilasa de las situinas.
5. La interacción productiva de la  $\beta$ -catenina con p300 requiere la unión de la  $\beta$ -catenina a LEF1, promovida por la glucosa.
6. La acumulación nuclear de la  $\beta$ -catenina promovida por la glucosa en presencia de la señalización de WNT o de litio es un fenómeno general que se da en células tumorales humanas de diversos orígenes: colon (HT-29), páncreas (AsPC-1), ovario (OVCAR3) y mama (MDA-MB-231).
7. El complejo LEF1/ $\beta$ -catenina formado en presencia de la glucosa y de las señales de WNT es un activador de los genes diana de WNT implicados en el metabolismo general, como *GIP* y *GCG*, y también críticos para la proliferación, como la *Ciclina D*.



## *Bibliografía*



1. Alrawi, S. J., Schiff, M., Carroll, R. E., Dayton, M., Gibbs, J. F., Kulavlat, M., Tan, D., Berman, K., Stoler, D. L., and Anderson, G. R., *Aberrant crypt foci*. *Anticancer Res*, 2006. 26(1A): p. 107-119.
2. Althage, M. C., Ford, E. L., Wang, S., Tso, P., Polonsky, K. S., and Wice, B. M., *Targeted ablation of glucose-dependent insulintropic polypeptide-producing cells in transgenic mice reduces obesity and insulin resistance induced by a high fat diet*. *J Biol Chem*, 2008. 283(26): p. 18365-18376.
3. Amit, S., Hatzubai, A., Birman, Y., Andersen, J. S., Ben-Shushan, E., Mann, M., Ben-Neriah, Y., and Alkalay, I., *Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway*. *Genes Dev*, 2002. 16(9): p. 1066-1076.
4. Anagnostou, S. H. and Shepherd, P. R., *Glucose induces an autocrine activation of the Wnt/beta-catenin pathway in macrophage cell lines*. *Biochem J*, 2008. 416(2): p. 211-218.
5. Arce, L., Yokoyama, N. N., and Waterman, M. L., *Diversity of LEF/TCF action in development and disease*. *Oncogene*, 2006. 25(57): p. 7492-7504.
6. Asally, M. and Yoneda, Y., *Beta-catenin can act as a nuclear import receptor for its partner transcription factor, lymphocyte enhancer factor-1 (lef-1)*. *Exp Cell Res*, 2005. 308(2): p. 357-363.
7. Ashrafian, H., Ahmed, K., Rowland, S. P., Patel, V. M., Gooderham, N. J., Holmes, E., Darzi, A., and Athanasiou, T., *Metabolic surgery and cancer: protective effects of bariatric procedures*. *Cancer*, 2011. 117(9): p. 1788-1799.
8. Bafico, A., Liu, G., Goldin, L., Harris, V., and Aaronson, S. A., *An autocrine mechanism for constitutive Wnt pathway activation in human cancer cells*. *Cancer Cell*, 2004. 6(5): p. 497-506.
9. Baggio, L. L. and Drucker, D. J., *Biology of incretins: GLP-1 and GIP*. *Gastroenterology*, 2007. 132(6): p. 2131-2157.
10. Bailey, C. J., Flatt, P. R., Kwasowski, P., Powell, C. J., and Marks, V., *Immunoreactive gastric inhibitory polypeptide and K cell hyperplasia in obese hyperglycaemic (ob/ob) mice fed high fat and high carbohydrate cafeteria diets*. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1986. 112(2): p. 224-229.
11. Barker, N., Huls, G., Korinek, V., and Clevers, H., *Restricted high level expression of Tcf-4 protein in intestinal and mammary gland epithelium*. *Am J Pathol*, 1999. 154(1): p. 29-35.
12. Batlle, E., Henderson, J. T., Beghtel, H., van den Born, M. M., Sancho, E., Huls, G., Meeldijk, J., Robertson, J., van de Wetering, M., Pawson, T., and Clevers, H., *Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB*. *Cell*, 2002. 111(2): p. 251-263.
13. Behrens, J., von Kries, J. P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W., *Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1*. *Nature*, 1996. 382(6592): p. 638-642.
14. Berndt, T., Craig, T. A., Bowe, A. E., Vassiliadis, J., Reczek, D., Finnegan, R., Jan De Beur, S. M., Schiavi, S. C., and Kumar, R., *Secreted frizzled-related protein 4 is a potent tumor-derived phosphaturic agent*. *J Clin Invest*, 2003. 112(5): p. 785-794.

15. Bienz, M. and Clevers, H., *Linking colorectal cancer to Wnt signaling*. Cell, 2000. 103(2): p. 311-320.
16. Bikkavilli, R. K., Feigin, M. E., and Malbon, C. C., *p38 mitogen-activated protein kinase regulates canonical Wnt-beta-catenin signaling by inactivation of GSK3beta*. J Cell Sci, 2008. 121(Pt 21): p. 3598-3607.
17. Billin, A. N., Thirlwell, H., and Ayer, D. E., *Beta-catenin-histone deacetylase interactions regulate the transition of LEF1 from a transcriptional repressor to an activator*. Mol Cell Biol, 2000. 20(18): p. 6882-6890.
18. Blander, G. and Guarente, L., *The Sir2 family of protein deacetylases*. Annu Rev Biochem, 2004. 73: p. 417-435.
19. Bourguignon, L. Y., Xia, W., and Wong, G., *Hyaluronan-mediated CD44 interaction with p300 and SIRT1 regulates beta-catenin signaling and NFkappaB-specific transcription activity leading to MDRI and Bcl-xL gene expression and chemoresistance in breast tumor cells*. J Biol Chem, 2009. 284(5): p. 2657-2671.
20. Brack, A. S., Conboy, M. J., Roy, S., Lee, M., Kuo, C. J., Keller, C., and Rando, T. A., *Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis*. Science, 2007. 317(5839): p. 807-810.
21. Brantjes, H., Roose, J., van De Wetering, M., and Clevers, H., *All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors*. Nucleic Acids Res, 2001. 29(7): p. 1410-1419.
22. Bruserud, O., Stapnes, C., Ersvaer, E., Gjertsen, B. T., and Rynningen, A., *Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment: a review of the clinical toxicity and the modulation of gene expression in cancer cell*. Curr Pharm Biotechnol, 2007. 8(6): p. 388-400.
23. Cabanes, A., Vidal, E., Aragones, N., Perez-Gomez, B., Pollan, M., Lope, V., and Lopez-Abente, G., *Cancer mortality trends in Spain: 1980-2007*. Ann Oncol, 2010. 21 Suppl 3: p. iii14-20.
24. Cadigan, K. M. and Liu, Y. I., *Wnt signaling: complexity at the surface*. J Cell Sci, 2006. 119(Pt 3): p. 395-402.
25. Cal, C., Garban, H., Jazirehi, A., Yeh, C., Mizutani, Y., and Bonavida, B., *Resveratrol and cancer: chemoprevention, apoptosis, and chemo-immunosensitizing activities*. Curr Med Chem Anticancer Agents, 2003. 3(2): p. 77-93.
26. Caverzasio, J. and Manen, D., *Essential role of Wnt3a-mediated activation of mitogen-activated protein kinase p38 for the stimulation of alkaline phosphatase activity and matrix mineralization in C3H10T1/2 mesenchymal cells*. Endocrinology, 2007. 148(11): p. 5323-5330.
27. Clevers, H., *Wnt/beta-catenin signaling in development and disease*. Cell, 2006. 127(3): p. 469-480.
28. Cong, F. and Varmus, H., *Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of beta-catenin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(9): p. 2882-2887.
29. Cook, D., Fry, M. J., Hughes, K., Sumathipala, R., Woodgett, J. R., and Dale, T. C., *Wingless inactivates glycogen synthase kinase-3 via an intracellular signalling pathway which involves a protein kinase C*. EMBO J, 1996. 15(17): p. 4526-4536.
30. Coyle, Y. M., *Lifestyle, genes, and cancer*. Methods Mol Biol, 2009. 472: p. 25-56.



31. Crawford, H. C., Fingleton, B. M., Rudolph-Owen, L. A., Goss, K. J., Rubinfeld, B., Polakis, P., and Matrisian, L. M., *The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors*. *Oncogene*, 1999. 18(18): p. 2883-2891.
32. Chang, J., Sonoyama, W., Wang, Z., Jin, Q., Zhang, C., Krebsbach, P. H., Giannobile, W., Shi, S., and Wang, C. Y., *Noncanonical Wnt-4 signaling enhances bone regeneration of mesenchymal stem cells in craniofacial defects through activation of p38 MAPK*. *J Biol Chem*, 2007. 282(42): p. 30938-30948.
33. Chen, S., Feng, B., George, B., Chakrabarti, R., Chen, M., and Chakrabarti, S., *Transcriptional coactivator p300 regulates glucose-induced gene expression in endothelial cells*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010. 298(1): p. E127-137.
34. Chen, W., ten Berge, D., Brown, J., Ahn, S., Hu, L. A., Miller, W. E., Caron, M. G., Barak, L. S., Nusse, R., and Lefkowitz, R. J., *Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4*. *Science*, 2003. 301(5638): p. 1391-1394.
35. Christodoulides, C., Laudes, M., Cawthorn, W. P., Schinner, S., Soos, M., O'Rahilly, S., Sethi, J. K., and Vidal-Puig, A., *The Wnt antagonist Dickkopf-1 and its receptors are coordinately regulated during early human adipogenesis*. *J Cell Sci*, 2006. 119(Pt 12): p. 2613-2620.
36. Damholt, A. B., Buchan, A. M., and Kofod, H., *Glucagon-like-peptide-1 secretion from canine L-cells is increased by glucose-dependent-insulinotropic peptide but unaffected by glucose*. *Endocrinology*, 1998. 139(4): p. 2085-2091.
37. Dann, C. E., Hsieh, J. C., Rattner, A., Sharma, D., Nathans, J., and Leahy, D. J., *Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains*. *Nature*, 2001. 412(6842): p. 86-90.
38. Donohoe, C. L., Pidgeon, G. P., Lysaght, J., and Reynolds, J. V., *Obesity and gastrointestinal cancer*. *Br J Surg*, 2010. 97(5): p. 628-642.
39. Drucker, D. J., *Biologic actions and therapeutic potential of the proglucagon-derived peptides*. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2005. 1(1): p. 22-31.
40. Drucker, D. J., Jin, T., Asa, S. L., Young, T. A., and Brubaker, P. L., *Activation of proglucagon gene transcription by protein kinase-A in a novel mouse enteroendocrine cell line*. *Mol Endocrinol*, 1994. 8(12): p. 1646-1655.
41. Duval, A., Rolland, S., Tubacher, E., Bui, H., Thomas, G., and Hamelin, R., *The human T-cell transcription factor-4 gene: structure, extensive characterization of alternative splicings, and mutational analysis in colorectal cancer cell lines*. *Cancer Res*, 2000. 60(14): p. 3872-3879.
42. Elrick, H., Stimmler, L., Hlad, C. J., Jr., and Arai, Y., *Plasma Insulin Response to Oral and Intravenous Glucose Administration*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1964. 24: p. 1076-1082.
43. Elliott, R. M., Morgan, L. M., Tredger, J. A., Deacon, S., Wright, J., and Marks, V., *Glucagon-like peptide-1 (7-36)amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns*. *J Endocrinol*, 1993. 138(1): p. 159-166.
44. Essers, M. A., de Vries-Smits, L. M., Barker, N., Polderman, P. E., Burgering, B. M., and Korswagen, H. C., *Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling*. *Science*, 2005. 308(5725): p. 1181-1184.

45. Fagotto, F., Gluck, U., and Gumbiner, B. M., *Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin*. Curr Biol, 1998. 8(4): p. 181-190.
46. Filali, M., Cheng, N., Abbott, D., Leontiev, V., and Engelhardt, J. F., *Wnt-3A/beta-catenin signaling induces transcription from the LEF-1 promoter*. J Biol Chem, 2002. 277(36): p. 33398-33410.
47. Firestein, R., Blander, G., Michan, S., Oberdoerffer, P., Ogino, S., Campbell, J., Bhimavarapu, A., Luikenhuis, S., de Cabo, R., Fuchs, C., Hahn, W. C., Guarente, L. P., and Sinclair, D. A., *The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth*. PLoS One, 2008. 3(4): p. e2020.
48. Flatt, P. R. and Bailey, C. J., *Glucose and insulin response to conditioned feeding in lean and genetically obese hyperglycemic (ob/ob) mice*. Metabolism, 1983. 32(5): p. 504-509.
49. Fujita, Y., Chui, J. W., King, D. S., Zhang, T., Seufert, J., Pownall, S., Cheung, A. T., and Kieffer, T. J., *Pax6 and Pdx1 are required for production of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in proglucagon-expressing L cells*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. 295(3): p. E648-657.
50. Ge, X., Jin, Q., Zhang, F., Yan, T., and Zhai, Q., *PCAF acetylates {beta}-catenin and improves its stability*. Mol Biol Cell, 2009. 20(1): p. 419-427.
51. Getty-Kaushik, L., Song, D. H., Boylan, M. O., Corkey, B. E., and Wolfe, M. M., *Glucose-dependent insulinotropic polypeptide modulates adipocyte lipolysis and reesterification*. Obesity (Silver Spring), 2006. 14(7): p. 1124-1131.
52. Giles, R. H., van Es, J. H., and Clevers, H., *Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer*. Biochim Biophys Acta, 2003. 1653(1): p. 1-24.
53. Gonzalez-Sancho, J. M., Aguilera, O., Garcia, J. M., Pendas-Franco, N., Pena, C., Cal, S., Garcia de Herreros, A., Bonilla, F., and Munoz, A., *The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer*. Oncogene, 2005. 24(6): p. 1098-1103.
54. Grant, S. F., Thorleifsson, G., Reynisdottir, I., Benediktsson, R., Manolescu, A., Sainz, J., Helgason, A., Stefansson, H., Emilsson, V., Helgadottir, A., Styrkarsdottir, U., Magnusson, K. P., Walters, G. B., Palsdottir, E., Jonsdottir, T., Gudmundsdottir, T., Gylfason, A., Saemundsdottir, J., Wilensky, R. L., Reilly, M. P., Rader, D. J., Bagger, Y., Christiansen, C., Gudnason, V., Sigurdsson, G., Thorsteinsdottir, U., Gulcher, J. R., Kong, A., and Stefansson, K., *Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes*. Nat Genet, 2006. 38(3): p. 320-323.
55. Gregory, M. A., Qi, Y., and Hann, S. R., *Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization*. J Biol Chem, 2003. 278(51): p. 51606-51612.
56. Grimes, C. A. and Jope, R. S., *CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium*. J Neurochem, 2001. 78(6): p. 1219-1232.
57. Gualberto, A. and Pollak, M., *Emerging role of insulin-like growth factor receptor inhibitors in oncology: early clinical trial results and future directions*. Oncogene, 2009. 28(34): p. 3009-3021.

58. He, T. C., Chan, T. A., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W., *PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. Cell, 1999. 99(3): p. 335-345.
59. He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W., *Identification of c-MYC as a target of the APC pathway*. Science, 1998. 281(5382): p. 1509-1512.
60. He, X., Semenov, M., Tamai, K., and Zeng, X., *LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way*. Development, 2004. 131(8): p. 1663-1677.
61. Hecht, A., Vleminckx, K., Stemmler, M. P., van Roy, F., and Kemler, R., *The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates*. EMBO J, 2000. 19(8): p. 1839-1850.
62. Hedgepeth, C. M., Conrad, L. J., Zhang, J., Huang, H. C., Lee, V. M., and Klein, P. S., *Activation of the Wnt signaling pathway: a molecular mechanism for lithium action*. Dev Biol, 1997. 185(1): p. 82-91.
63. Herrmann, C., Goke, R., Richter, G., Fehmann, H. C., Arnold, R., and Goke, B., *Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients*. Digestion, 1995. 56(2): p. 117-126.
64. Hill, M. E., Asa, S. L., and Drucker, D. J., *Essential requirement for Pax6 in control of enteroendocrine proglucagon gene transcription*. Mol Endocrinol, 1999. 13(9): p. 1474-1486.
65. Hoeflich, K. P., Luo, J., Rubie, E. A., Tsao, M. S., Jin, O., and Woodgett, J. R., *Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation*. Nature, 2000. 406(6791): p. 86-90.
66. Holst, J. J. and Gromada, J., *Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. 287(2): p. E199-206.
67. Hoogeboom, D., Essers, M. A., Polderman, P. E., Voets, E., Smits, L. M., and Burgering, B. M., *Interaction of FOXO with beta-catenin inhibits beta-catenin/T cell factor activity*. J Biol Chem, 2008. 283(14): p. 9224-9230.
68. Hoppler, S. and Kavanagh, C. L., *Wnt signalling: variety at the core*. J Cell Sci, 2007. 120(Pt 3): p. 385-393.
69. Hovanes, K., Li, T. W., and Waterman, M. L., *The human LEF-1 gene contains a promoter preferentially active in lymphocytes and encodes multiple isoforms derived from alternative splicing*. Nucleic Acids Res, 2000. 28(9): p. 1994-2003.
70. Hovanes, K., Li, T. W., Munguia, J. E., Truong, T., Milovanovic, T., Lawrence Marsh, J., Holcombe, R. F., and Waterman, M. L., *Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer*. Nat Genet, 2001. 28(1): p. 53-57.
71. Huber, O., Korn, R., McLaughlin, J., Ohsugi, M., Herrmann, B. G., and Kemler, R., *Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1*. Mech Dev, 1996. 59(1): p. 3-10.

72. Humphrey, R. K., Yu, S. M., Flores, L. E., and Jhala, U. S., *Glucose regulates steady-state levels of PDX1 via the reciprocal actions of GSK3 and AKT kinases*. J Biol Chem, 2010. 285(5): p. 3406-3416.
73. Iizuka, K. and Horikawa, Y., *ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome*. Endocr J, 2008. 55(4): p. 617-624.
74. Irwin, N., McClean, P. L., O'Harte, F. P., Gault, V. A., Harriott, P., and Flatt, P. R., *Early administration of the glucose-dependent insulinitropic polypeptide receptor antagonist (Pro3)GIP prevents the development of diabetes and related metabolic abnormalities associated with genetically inherited obesity in ob/ob mice*. Diabetologia, 2007. 50(7): p. 1532-1540.
75. Irwin, N., Gault, V. A., Green, B. D., Greer, B., McCluskey, J. T., Harriott, P., O'Harte, F. P., and Flatt, P. R., *Effects of short-term chemical ablation of the GIP receptor on insulin secretion, islet morphology and glucose homeostasis in mice*. Biol Chem, 2004. 385(9): p. 845-852.
76. Iwao, K., Nakamori, S., Kameyama, M., Imaoka, S., Kinoshita, M., Fukui, T., Ishiguro, S., Nakamura, Y., and Miyoshi, Y., *Activation of the beta-catenin gene by interstitial deletions involving exon 3 in primary colorectal carcinomas without adenomatous polyposis coli mutations*. Cancer Res, 1998. 58(5): p. 1021-1026.
77. Iyer, N. G., Ozdag, H., and Caldas, C., *p300/CBP and cancer*. Oncogene, 2004. 23(24): p. 4225-4231.
78. Jepeal, L. I., Boylan, M. O., and Wolfe, M. M., *Cell-specific expression of the glucose-dependent insulinitropic polypeptide gene functions through a GATA and an ISL-1 motif in a mouse neuroendocrine tumor cell line*. Regul Pept, 2003. 113(1-3): p. 139-147.
79. Jepeal, L. I., Fujitani, Y., Boylan, M. O., Wilson, C. N., Wright, C. V., and Wolfe, M. M., *Cell-specific expression of glucose-dependent-insulinitropic polypeptide is regulated by the transcription factor PDX-1*. Endocrinology, 2005. 146(1): p. 383-391.
80. Jho, E. H., Zhang, T., Domon, C., Joo, C. K., Freund, J. N., and Costantini, F., *Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway*. Mol Cell Biol, 2002. 22(4): p. 1172-1183.
81. Ji, B. T., Weissfeld, J. L., Chow, W. H., Huang, W. Y., Schoen, R. E., and Hayes, R. B., *Tobacco smoking and colorectal hyperplastic and adenomatous polyps*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. 15(5): p. 897-901.
82. Jin, T. and Drucker, D. J., *Activation of proglucagon gene transcription through a novel promoter element by the caudal-related homeodomain protein cdx-2/3*. Mol Cell Biol, 1996. 16(1): p. 19-28.
83. Jope, R. S., *Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes*. Trends Pharmacol Sci, 2003. 24(9): p. 441-443.
84. Kant, P. and Hull, M. A., *Excess body weight and obesity--the link with gastrointestinal and hepatobiliary cancer*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011. 8(4): p. 224-238.
85. Kataoka, K., Shioda, S., Ando, K., Sakagami, K., Handa, H., and Yasuda, K., *Differentially expressed Maf family transcription factors, c-Maf and MafA, activate*

- glucagon and insulin gene expression in pancreatic islet alpha- and beta-cells.* J Mol Endocrinol, 2004. 32(1): p. 9-20.
86. Kawano, Y. and Kypta, R., *Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway.* J Cell Sci, 2003. 116(Pt 13): p. 2627-2634.
  87. Kemler, R., Ozawa, M., and Ringwald, M., *Calcium-dependent cell adhesion molecules.* Curr Opin Cell Biol, 1989. 1(5): p. 892-897.
  88. Khandekar, M. J., Cohen, P., and Spiegelman, B. M., *Molecular mechanisms of cancer development in obesity.* Nat Rev Cancer, 2011. 11(12): p. 886-895.
  89. Ki, H., Oh, M., Chung, S. W., and Kim, K., *Beta-catenin can bind directly to CRM1 independently of adenomatous polyposis coli, which affects its nuclear localization and LEF-1/beta-catenin-dependent gene expression.* Cell Biol Int, 2008. 32(4): p. 394-400.
  90. Kikuchi, A., Yamamoto, H., and Kishida, S., *Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors.* Cell Signal, 2007. 19(4): p. 659-671.
  91. Kim, B., Kim, S. J., Son, J. I., and Joo, Y. H., *Weight change in the acute treatment of bipolar I disorder: a naturalistic observational study of psychiatric inpatients.* J Affect Disord, 2008. 105(1-3): p. 45-52.
  92. Kim, J. S., Crooks, H., Dracheva, T., Nishanian, T. G., Singh, B., Jen, J., and Waldman, T., *Oncogenic beta-catenin is required for bone morphogenetic protein 4 expression in human cancer cells.* Cancer Res, 2002. 62(10): p. 2744-2748.
  93. Kim, K. and Hay, E. D., *New evidence that nuclear import of endogenous beta-catenin is LEF-1 dependent, while LEF-1 independent import of exogenous beta-catenin leads to nuclear abnormalities.* Cell Biol Int, 2001. 25(11): p. 1149-1161.
  94. Kim, Y. S. and Milner, J. A., *Dietary modulation of colon cancer risk.* J Nutr, 2007. 137(11 Suppl): p. 2576S-2579S.
  95. Knepel, W., Chafitz, J., and Habener, J. F., *Transcriptional activation of the rat glucagon gene by the cyclic AMP-responsive element in pancreatic islet cells.* Mol Cell Biol, 1990. 10(12): p. 6799-6804.
  96. Koh, T. J., Bulitta, C. J., Fleming, J. V., Dockray, G. J., Varro, A., and Wang, T. C., *Gastrin is a target of the beta-catenin/TCF-4 growth-signaling pathway in a model of intestinal polyposis.* J Clin Invest, 2000. 106(4): p. 533-539.
  97. Kohn, A. D. and Moon, R. T., *Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways.* Cell Calcium, 2005. 38(3-4): p. 439-446.
  98. Koike, M., Kose, S., Furuta, M., Taniguchi, N., Yokoya, F., Yoneda, Y., and Imamoto, N., *beta-Catenin shows an overlapping sequence requirement but distinct molecular interactions for its bidirectional passage through nuclear pores.* J Biol Chem, 2004. 279(32): p. 34038-34047.
  99. Kolligs, F. T., Nieman, M. T., Winer, I., Hu, G., Van Mater, D., Feng, Y., Smith, I. M., Wu, R., Zhai, Y., Cho, K. R., and Fearon, E. R., *ITF-2, a downstream target of the Wnt/TCF pathway, is activated in human cancers with beta-catenin defects and promotes neoplastic transformation.* Cancer Cell, 2002. 1(2): p. 145-155.
  100. Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P. J., and Clevers, H., *Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4.* Nat Genet, 1998. 19(4): p. 379-383.



101. Kuhnert, F., Davis, C. R., Wang, H. T., Chu, P., Lee, M., Yuan, J., Nusse, R., and Kuo, C. J., *Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(1): p. 266-271.
102. Labalette, C., Renard, C. A., Neuveut, C., Buendia, M. A., and Wei, Y., *Interaction and functional cooperation between the LIM protein FHL2, CBP/p300, and beta-catenin*. Mol Cell Biol, 2004. 24(24): p. 10689-10702.
103. Laser, B., Meda, P., Constant, I., and Philippe, J., *The caudal-related homeodomain protein Cdx-2/3 regulates glucagon gene expression in islet cells*. J Biol Chem, 1996. 271(46): p. 28984-28994.
104. Lavu, S., Boss, O., Elliott, P. J., and Lambert, P. D., *Sirtuins--novel therapeutic targets to treat age-associated diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2008. 7(10): p. 841-853.
105. Lee, E., Salic, A., Kruger, R., Heinrich, R., and Kirschner, M. W., *The roles of APC and Axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway*. PLoS Biol, 2003. 1(1): p. E10.
106. Lefrancois-Martinez, A. M., Martinez, A., Antoine, B., Raymondjean, M., and Kahn, A., *Upstream stimulatory factor proteins are major components of the glucose response complex of the L-type pyruvate kinase gene promoter*. J Biol Chem, 1995. 270(6): p. 2640-2643.
107. Letamendia, A., Labbe, E., and Attisano, L., *Transcriptional regulation by Smads: crosstalk between the TGF-beta and Wnt pathways*. J Bone Joint Surg Am, 2001. 83-A Suppl 1(Pt 1): p. S31-39.
108. Levy, L., Wei, Y., Labalette, C., Wu, Y., Renard, C. A., Buendia, M. A., and Neuveut, C., *Acetylation of beta-catenin by p300 regulates beta-catenin-Tcf4 interaction*. Mol Cell Biol, 2004. 24(8): p. 3404-3414.
109. Li, J., Sutter, C., Parker, D. S., Blauwkamp, T., Fang, M., and Cadigan, K. M., *CBP/p300 are bimodal regulators of Wnt signaling*. EMBO J, 2007. 26(9): p. 2284-2294.
110. Libby, G., Donnelly, L. A., Donnan, P. T., Alessi, D. R., Morris, A. D., and Evans, J. M., *New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2009. 32(9): p. 1620-1625.
111. Lin, O. S., *Acquired risk factors for colorectal cancer*. Methods Mol Biol, 2009. 472: p. 361-372.
112. Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G. H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., and He, X., *Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism*. Cell, 2002. 108(6): p. 837-847.
113. Liu, H., Fergusson, M. M., Wu, J. J., Rovira, II, Liu, J., Gavrilova, O., Lu, T., Bao, J., Han, D., Sack, M. N., and Finkel, T., *Wnt signaling regulates hepatic metabolism*. Sci Signal, 2011. 4(158): p. ra6.
114. Liu, H., Fergusson, M. M., Castilho, R. M., Liu, J., Cao, L., Chen, J., Malide, D., Rovira, II, Schimel, D., Kuo, C. J., Gutkind, J. S., Hwang, P. M., and Finkel, T., *Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging*. Science, 2007. 317(5839): p. 803-806.

115. Liu, Z. and Habener, J. F., *Glucagon-like peptide-1 activation of TCF7L2-dependent Wnt signaling enhances pancreatic beta cell proliferation*. J Biol Chem, 2008. 283(13): p. 8723-8735.
116. Logan, C. Y. and Nusse, R., *The Wnt signaling pathway in development and disease*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. 20: p. 781-810.
117. Lomvardas, S. and Thanos, D., *Modifying gene expression programs by altering core promoter chromatin architecture*. Cell, 2002. 110(2): p. 261-271.
118. Lynn, F. C., Pamir, N., Ng, E. H., McIntosh, C. H., Kieffer, T. J., and Pederson, R. A., *Defective glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor expression in diabetic fatty Zucker rats*. Diabetes, 2001. 50(5): p. 1004-1011.
119. Lynn, F. C., Thompson, S. A., Pospisilik, J. A., Ehses, J. A., Hinke, S. A., Pamir, N., McIntosh, C. H., and Pederson, R. A., *A novel pathway for regulation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor expression in beta cells*. FASEB J, 2003. 17(1): p. 91-93.
120. Lyssenko, V., *The transcription factor 7-like 2 gene and increased risk of type 2 diabetes: an update*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2008. 11(4): p. 385-392.
121. Macfarlane, W. M., McKinnon, C. M., Felton-Edkins, Z. A., Cragg, H., James, R. F., and Docherty, K., *Glucose stimulates translocation of the homeodomain transcription factor PDX1 from the cytoplasm to the nucleus in pancreatic beta-cells*. J Biol Chem, 1999. 274(2): p. 1011-1016.
122. Macko, A. R., Beneze, A. N., Teachey, M. K., and Henriksen, E. J., *Roles of insulin signalling and p38 MAPK in the activation by lithium of glucose transport in insulin-resistant rat skeletal muscle*. Arch Physiol Biochem, 2008. 114(5): p. 331-339.
123. Manji, H. K. and Lenox, R. H., *Ziskind-Somerfeld Research Award. Protein kinase C signaling in the brain: molecular transduction of mood stabilization in the treatment of manic-depressive illness*. Biol Psychiatry, 1999. 46(10): p. 1328-1351.
124. Mann, B., Gelos, M., Siedow, A., Hanski, M. L., Gratchev, A., Ilyas, M., Bodmer, W. F., Moyer, M. P., Riecken, E. O., Buhr, H. J., and Hanski, C., *Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(4): p. 1603-1608.
125. Marks, P. A., *The clinical development of histone deacetylase inhibitors as targeted anticancer drugs*. Expert Opin Investig Drugs, 2010. 19(9): p. 1049-1066.
126. Martinez, S. C., Cras-Meneur, C., Bernal-Mizrachi, E., and Permutt, M. A., *Glucose regulates Foxo1 through insulin receptor signaling in the pancreatic islet beta-cell*. Diabetes, 2006. 55(6): p. 1581-1591.
127. Mayo, K. E., Miller, L. J., Bataille, D., Dalle, S., Goke, B., Thorens, B., and Drucker, D. J., *International Union of Pharmacology. XXXV. The glucagon receptor family*. Pharmacol Rev, 2003. 55(1): p. 167-194.
128. McClean, P. L., Irwin, N., Cassidy, R. S., Holst, J. J., Gault, V. A., and Flatt, P. R., *GIP receptor antagonism reverses obesity, insulin resistance, and associated metabolic disturbances induced in mice by prolonged consumption of high-fat diet*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. 293(6): p. E1746-1755.

129. McIntosh, C. H., Widenmaier, S., and Kim, S. J., *Glucose-dependent insulintropic polypeptide (Gastric Inhibitory Polypeptide; GIP)*. Vitam Horm, 2009. 80: p. 409-471.
130. McIntyre, N., Holdsworth, C. D., and Turner, D. S., *Intestinal factors in the control of insulin secretion*. J Clin Endocrinol Metab, 1965. 25(10): p. 1317-1324.
131. McKinnon, C. M., Ravier, M. A., and Rutter, G. A., *FoxO1 is required for the regulation of preproglucagon gene expression by insulin in pancreatic alphaTC1-9 cells*. J Biol Chem, 2006. 281(51): p. 39358-39369.
132. Mentlein, R., Gallwitz, B., and Schmidt, W. E., *Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum*. Eur J Biochem, 1993. 214(3): p. 829-835.
133. Mikels, A. J. and Nusse, R., *Wnts as ligands: processing, secretion and reception*. Oncogene, 2006. 25(57): p. 7461-7468.
134. Mingrone, G., *Role of the incretin system in the remission of type 2 diabetes following bariatric surgery*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2008. 18(8): p. 574-579.
135. Mirabelli-Primdahl, L., Gryfe, R., Kim, H., Millar, A., Luceri, C., Dale, D., Holowaty, E., Bapat, B., Gallinger, S., and Redston, M., *Beta-catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway*. Cancer Res, 1999. 59(14): p. 3346-3351.
136. Miwa, N., Furuse, M., Tsukita, S., Niikawa, N., Nakamura, Y., and Furukawa, Y., *Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers*. Oncol Res, 2001. 12(11-12): p. 469-476.
137. Miyawaki, K., Yamada, Y., Yano, H., Niwa, H., Ban, N., Ihara, Y., Kubota, A., Fujimoto, S., Kajikawa, M., Kuroe, A., Tsuda, K., Hashimoto, H., Yamashita, T., Jomori, T., Tashiro, F., Miyazaki, J., and Seino, Y., *Glucose intolerance caused by a defect in the entero-insular axis: a study in gastric inhibitory polypeptide receptor knockout mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(26): p. 14843-14847.
138. Mosley, A. L. and Ozcan, S., *Glucose regulates insulin gene transcription by hyperacetylation of histone h4*. J Biol Chem, 2003. 278(22): p. 19660-19666.
139. Mosley, A. L., Corbett, J. A., and Ozcan, S., *Glucose regulation of insulin gene expression requires the recruitment of p300 by the beta-cell-specific transcription factor Pdx-1*. Mol Endocrinol, 2004. 18(9): p. 2279-2290.
140. Munoz-Montano, J. R., Lim, F., Moreno, F. J., Avila, J., and Diaz-Nido, J., *Glycogen Synthase Kinase-3 Modulates Neurite Outgrowth in Cultured Neurons: Possible Implications for Neurite Pathology in Alzheimer's Disease*. J Alzheimers Dis, 1999. 1(6): p. 361-378.
141. Nagafuchi, A. and Takeichi, M., *Transmembrane control of cadherin-mediated cell adhesion: a 94 kDa protein functionally associated with a specific region of the cytoplasmic domain of E-cadherin*. Cell Regul, 1989. 1(1): p. 37-44.
142. Naito, A. T., Akazawa, H., Takano, H., Minamino, T., Nagai, T., Aburatani, H., and Komuro, I., *Phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway plays a critical role in early cardiomyogenesis by regulating canonical Wnt signaling*. Circ Res, 2005. 97(2): p. 144-151.



143. Nauck, M., Schmidt, W. E., Ebert, R., Strietzel, J., Cantor, P., Hoffmann, G., and Creutzfeldt, W., *Insulinotropic properties of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in man: interactions with glucose, phenylalanine, and cholecystokinin-8*. J Clin Endocrinol Metab, 1989. 69(3): p. 654-662.
144. Nauck, M. A., Bartels, E., Orskov, C., Ebert, R., and Creutzfeldt, W., *Additive insulinotropic effects of exogenous synthetic human gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1-(7-36) amide infused at near-physiological insulinotropic hormone and glucose concentrations*. J Clin Endocrinol Metab, 1993. 76(4): p. 912-917.
145. Nauck, M. A., Heimesaat, M. M., Orskov, C., Holst, J. J., Ebert, R., and Creutzfeldt, W., *Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus*. J Clin Invest, 1993. 91(1): p. 301-307.
146. Nauck, M. A., Homberger, E., Siegel, E. G., Allen, R. C., Eaton, R. P., Ebert, R., and Creutzfeldt, W., *Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses*. J Clin Endocrinol Metab, 1986. 63(2): p. 492-498.
147. Neufeld, K. L., Zhang, F., Cullen, B. R., and White, R. L., *APC-mediated downregulation of beta-catenin activity involves nuclear sequestration and nuclear export*. EMBO Rep, 2000. 1(6): p. 519-523.
148. Ni, Z., Anini, Y., Fang, X., Mills, G., Brubaker, P. L., and Jin, T., *Transcriptional activation of the proglucagon gene by lithium and beta-catenin in intestinal endocrine L cells*. J Biol Chem, 2003. 278(2): p. 1380-1387.
149. Niida, A., Hiroko, T., Kasai, M., Furukawa, Y., Nakamura, Y., Suzuki, Y., Sugano, S., and Akiyama, T., *DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway*. Oncogene, 2004. 23(52): p. 8520-8526.
150. Nowell, P. C., *The clonal evolution of tumor cell populations*. Science, 1976. 194(4260): p. 23-28.
151. Nuche-Berenguer, B., Portal-Nunez, S., Moreno, P., Gonzalez, N., Acitores, A., Lopez-Herradon, A., Esbrit, P., Valverde, I., and Villanueva-Penacarrillo, M. L., *Presence of a functional receptor for GLP-1 in osteoblastic cells, independent of the cAMP-linked GLP-1 receptor*. J Cell Physiol, 2010. 225(2): p. 585-592.
152. Nusse, R., Brown, A., Papkoff, J., Scambler, P., Shackleford, G., McMahon, A., Moon, R., and Varmus, H., *A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family*. Cell, 1991. 64(2): p. 231.
153. Nyberg, J., Anderson, M. F., Meister, B., Alborn, A. M., Strom, A. K., Brederlau, A., Illerskog, A. C., Nilsson, O., Kieffer, T. J., Hietala, M. A., Ricksten, A., and Eriksson, P. S., *Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is expressed in adult hippocampus and induces progenitor cell proliferation*. J Neurosci, 2005. 25(7): p. 1816-1825.
154. Okada, N., Ishigami, Y., Suzuki, T., Kaneko, A., Yasui, K., Fukutomi, R., and Isemura, M., *Importins and exportins in cellular differentiation*. J Cell Mol Med, 2008. 12(5B): p. 1863-1871.

155. Orford, K., Crockett, C., Jensen, J. P., Weissman, A. M., and Byers, S. W., *Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin*. J Biol Chem, 1997. 272(40): p. 24735-24738.
156. Orsulic, S. and Peifer, M., *An in vivo structure-function study of armadillo, the beta-catenin homologue, reveals both separate and overlapping regions of the protein required for cell adhesion and for wingless signaling*. J Cell Biol, 1996. 134(5): p. 1283-1300.
157. Pardo, R., Andreolotti, A. G., Ramos, B., Picatoste, F., and Claro, E., *Opposed effects of lithium on the MEK-ERK pathway in neural cells: inhibition in astrocytes and stimulation in neurons by GSK3 independent mechanisms*. J Neurochem, 2003. 87(2): p. 417-426.
158. Parker, H. E., Reimann, F., and Gribble, F. M., *Molecular mechanisms underlying nutrient-stimulated incretin secretion*. Expert Rev Mol Med, 2010. 12: p. e1.
159. Parker, H. E., Habib, A. M., Rogers, G. J., Gribble, F. M., and Reimann, F., *Nutrient-dependent secretion of glucose-dependent insulintropic polypeptide from primary murine K cells*. Diabetologia, 2009. 52(2): p. 289-298.
160. Perry, J. M., He, X. C., Sugimura, R., Grindley, J. C., Haug, J. S., Ding, S., and Li, L., *Cooperation between both Wnt/ $\beta$ -catenin and PTEN/PI3K/Akt signaling promotes primitive hematopoietic stem cell self-renewal and expansion*. Genes Dev, 2011. 25(18): p. 1928-1942.
161. Perry, T., Haughey, N. J., Mattson, M. P., Egan, J. M., and Greig, N. H., *Protection and reversal of excitotoxic neuronal damage by glucagon-like peptide-1 and exendin-4*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. 302(3): p. 881-888.
162. Perry, T., Lahiri, D. K., Chen, D., Zhou, J., Shaw, K. T., Egan, J. M., and Greig, N. H., *A novel neurotrophic property of glucagon-like peptide 1: a promoter of nerve growth factor-mediated differentiation in PC12 cells*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. 300(3): p. 958-966.
163. Philippe, J., *Insulin regulation of the glucagon gene is mediated by an insulin-responsive DNA element*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(16): p. 7224-7227.
164. Philippe, J., Morel, C., and Prezioso, V. R., *Glucagon gene expression is negatively regulated by hepatocyte nuclear factor 3 beta*. Mol Cell Biol, 1994. 14(5): p. 3514-3523.
165. Philippe, J., Drucker, D. J., Knepel, W., Jepeal, L., Misulovin, Z., and Habener, J. F., *Alpha-cell-specific expression of the glucagon gene is conferred to the glucagon promoter element by the interactions of DNA-binding proteins*. Mol Cell Biol, 1988. 8(11): p. 4877-4888.
166. Piatkiewicz, P. and Czech, A., *Glucose metabolism disorders and the risk of cancer*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2011. 59(3): p. 215-230.
167. Pinson, K. I., Brennan, J., Monkley, S., Avery, B. J., and Skarnes, W. C., *An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice*. Nature, 2000. 407(6803): p. 535-538.
168. Pinto, D. and Clevers, H., *Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium*. Exp Cell Res, 2005. 306(2): p. 357-363.

169. Pisani, P., *Hyper-insulinaemia and cancer, meta-analyses of epidemiological studies*. Arch Physiol Biochem, 2008. 114(1): p. 63-70.
170. Pollak, M., *Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia*. Nat Rev Cancer, 2008. 8(12): p. 915-928.
171. Pruitt, K., Zinn, R. L., Ohm, J. E., McGarvey, K. M., Kang, S. H., Watkins, D. N., Herman, J. G., and Baylin, S. B., *Inhibition of SIRT1 reactivates silenced cancer genes without loss of promoter DNA hypermethylation*. PLoS Genet, 2006. 2(3): p. e40.
172. Radtke, F. and Clevers, H., *Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin*. Science, 2005. 307(5717): p. 1904-1909.
173. Rao, R. S. and Kini, S., *GIP and bariatric surgery*. Obes Surg, 2011. 21(2): p. 244-252.
174. Reichsman, F., Smith, L., and Cumberledge, S., *Glycosaminoglycans can modulate extracellular localization of the wingless protein and promote signal transduction*. J Cell Biol, 1996. 135(3): p. 819-827.
175. Reya, T., O'Riordan, M., Okamura, R., Devaney, E., Willert, K., Nusse, R., and Grosschedl, R., *Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism*. Immunity, 2000. 13(1): p. 15-24.
176. Rindi, G., Grant, S. G., Yiangou, Y., Ghatei, M. A., Bloom, S. R., Bautch, V. L., Solcia, E., and Polak, J. M., *Development of neuroendocrine tumors in the gastrointestinal tract of transgenic mice. Heterogeneity of hormone expression*. Am J Pathol, 1990. 136(6): p. 1349-1363.
177. Ritz-Laser, B., Estreicher, A., Gauthier, B., and Philippe, J., *The paired homeodomain transcription factor Pax-2 is expressed in the endocrine pancreas and transactivates the glucagon gene promoter*. J Biol Chem, 2000. 275(42): p. 32708-32715.
178. Romero-Garcia, S., Lopez-Gonzalez, J. S., Baez-Viveros, J. L., Aguilar-Cazares, D., and Prado-Garcia, H., *Tumor cell metabolism: An integral view*. Cancer Biol Ther, 2011. 12(11).
179. Roose, J. and Clevers, H., *TCF transcription factors: molecular switches in carcinogenesis*. Biochim Biophys Acta, 1999. 1424(2-3): p. M23-37.
180. Roose, J., Huls, G., van Beest, M., Moerer, P., van der Horn, K., Goldschmeding, R., Logtenberg, T., and Clevers, H., *Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1*. Science, 1999. 285(5435): p. 1923-1926.
181. Rosta, A., *[Diabetes and cancer risk: oncologic considerations]*. Orv Hetil, 2011. 152(29): p. 1144-1155.
182. Rubinfeld, B., Robbins, P., El-Gamil, M., Albert, I., Porfiri, E., and Polakis, P., *Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines*. Science, 1997. 275(5307): p. 1790-1792.
183. Rulifson, I. C., Karnik, S. K., Heiser, P. W., ten Berge, D., Chen, H., Gu, X., Taketo, M. M., Nusse, R., Hebrok, M., and Kim, S. K., *Wnt signaling regulates pancreatic beta cell proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(15): p. 6247-6252.
184. Ryves, W. J. and Harwood, A. J., *Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. 280(3): p. 720-725.

185. Saxena, R., Gianniny, L., Burt, N. P., Lyssenko, V., Giudecci, C., Sjogren, M., Florez, J. C., Almgren, P., Isomaa, B., Orho-Melander, M., Lindblad, U., Daly, M. J., Tuomi, T., Hirschhorn, J. N., Ardlie, K. G., Groop, L. C., and Altshuler, D., *Common single nucleotide polymorphisms in TCF7L2 are reproducibly associated with type 2 diabetes and reduce the insulin response to glucose in nondiabetic individuals*. Diabetes, 2006. 55(10): p. 2890-2895.
186. Saxena, R., Hivert, M. F., Langenberg, C., Tanaka, T., Pankow, J. S., Vollenweider, P., Lyssenko, V., Bouatia-Naji, N., Dupuis, J., Jackson, A. U., Kao, W. H., Li, M., Glazer, N. L., Manning, A. K., Luan, J., Stringham, H. M., Prokopenko, I., Johnson, T., Grarup, N., Boesgaard, T. W., Lecoeur, C., Shrader, P., O'Connell, J., Ingelsson, E., Couper, D. J., Rice, K., Song, K., Andreasen, C. H., Dina, C., Kottgen, A., Le Bacquer, O., Pattou, F., Taneera, J., Steinthorsdottir, V., Rybin, D., Ardlie, K., Sampson, M., Qi, L., van Hoek, M., Weedon, M. N., Aulchenko, Y. S., Voight, B. F., Grallert, H., Balkau, B., Bergman, R. N., Bielski, S. J., Bonnefond, A., Bonnycastle, L. L., Borch-Johnsen, K., Bottcher, Y., Brunner, E., Buchanan, T. A., Bumpstead, S. J., Cavalcanti-Proenca, C., Charpentier, G., Chen, Y. D., Chines, P. S., Collins, F. S., Cornelis, M., G, J. C., Delplanque, J., Doney, A., Egan, J. M., Erdos, M. R., Firmann, M., Forouhi, N. G., Fox, C. S., Goodarzi, M. O., Graessler, J., Hingorani, A., Isomaa, B., Jorgensen, T., Kivimaki, M., Kovacs, P., Krohn, K., Kumari, M., Lauritzen, T., Levy-Marchal, C., Mayor, V., McAteer, J. B., Meyre, D., Mitchell, B. D., Mohlke, K. L., Morken, M. A., Narisu, N., Palmer, C. N., Pakyz, R., Pascoe, L., Payne, F., Pearson, D., Rathmann, W., Sandbaek, A., Sayer, A. A., Scott, L. J., Sharp, S. J., Sijbrands, E., Singleton, A., Siscovick, D. S., Smith, N. L., Sparso, T., Swift, A. J., Syddall, H., Thorleifsson, G., Tonjes, A., Tuomi, T., Tuomilehto, J., Valle, T. T., Waeber, G., Walley, A., Waterworth, D. M., Zeggini, E., Zhao, J. H., Illig, T., Wichmann, H. E., Wilson, J. F., van Duijn, C., Hu, F. B., Morris, A. D., Frayling, T. M., Hattersley, A. T., Thorsteinsdottir, U., Stefansson, K., Nilsson, P., Syvanen, A. C., Shuldiner, A. R., Walker, M., Bornstein, S. R., Schwarz, P., Williams, G. H., Nathan, D. M., Kuusisto, J., Laakso, M., Cooper, C., Marmot, M., Ferrucci, L., Mooser, V., Stumvoll, M., Loos, R. J., Altshuler, D., Psaty, B. M., Rotter, J. I., Boerwinkle, E., Hansen, T., Pedersen, O., Florez, J. C., McCarthy, M. I., Boehnke, M., Barroso, I., Sladek, R., Froguel, P., Meigs, J. B., Groop, L., Wareham, N. J. and Watanabe, R. M., *Genetic variation in GIPR influences the glucose and insulin responses to an oral glucose challenge*. Nat Genet, 2010. 42(2): p. 142-148.
187. Saydah, S. H., Platz, E. A., Rifai, N., Pollak, M. N., Brancati, F. L., and Helzlsouer, K. J., *Association of markers of insulin and glucose control with subsequent colorectal cancer risk*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2003. 12(5): p. 412-418.
188. Schafer, S. A., Tschritter, O., Machicao, F., Thamer, C., Stefan, N., Gallwitz, B., Holst, J. J., Dekker, J. M., t Hart, L. M., Nijpels, G., van Haeften, T. W., Haring, H. U., and Fritsche, A., *Impaired glucagon-like peptide-1-induced insulin secretion in carriers of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene polymorphisms*. Diabetologia, 2007. 50(12): p. 2443-2450.
189. Schepsky, A., Bruser, K., Gunnarsson, G. J., Goodall, J., Hallsson, J. H., Goding, C. R., Steingrimsson, E., and Hecht, A., *The microphthalmia-associated transcription factor Mitf interacts with beta-catenin to determine target gene expression*. Mol Cell Biol, 2006. 26(23): p. 8914-8927.
190. Schinner, S., Ulgen, F., Papewalis, C., Schott, M., Woelk, A., Vidal-Puig, A., and Scherbaum, W. A., *Regulation of insulin secretion, glucokinase gene transcription*

- and beta cell proliferation by adipocyte-derived Wnt signalling molecules.* Diabetologia, 2008. 51(1): p. 147-154.
191. Schjoldager, B. T., Mortensen, P. E., Christiansen, J., Orskov, C., and Holst, J. J., *GLP-1 (glucagon-like peptide 1) and truncated GLP-1, fragments of human proglucagon, inhibit gastric acid secretion in humans.* Dig Dis Sci, 1989. 34(5): p. 703-708.
  192. Schneikert, J. and Behrens, J., *The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development.* Gut, 2007. 56(3): p. 417-425.
  193. Sharma, M., Chuang, W. W., and Sun, Z., *Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt stimulates androgen pathway through GSK3beta inhibition and nuclear beta-catenin accumulation.* J Biol Chem, 2002. 277(34): p. 30935-30941.
  194. Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., and Ben-Ze'ev, A., *The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(10): p. 5522-5527.
  195. Shu, L., Sauter, N. S., Schulthess, F. T., Matveyenko, A. V., Oberholzer, J., and Maedler, K., *Transcription factor 7-like 2 regulates beta-cell survival and function in human pancreatic islets.* Diabetes, 2008. 57(3): p. 645-653.
  196. Sinclair, E. M. and Drucker, D. J., *Proglucagon-derived peptides: mechanisms of action and therapeutic potential.* Physiology (Bethesda), 2005. 20: p. 357-365.
  197. Someya, Y., Inagaki, N., Maekawa, T., Seino, Y., and Ishii, S., *Two 3',5'-cyclic-adenosine monophosphate response elements in the promoter region of the human gastric inhibitory polypeptide gene.* FEBS Lett, 1993. 317(1-2): p. 67-73.
  198. Sorokin, A. V., Kim, E. R., and Ovchinnikov, L. P., *Nucleocytoplasmic transport of proteins.* Biochemistry (Mosc), 2007. 72(13): p. 1439-1457.
  199. Sparks, A. B., Morin, P. J., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W., *Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer.* Cancer Res, 1998. 58(6): p. 1130-1134.
  200. Stattin, P., Bjor, O., Ferrari, P., Lukanova, A., Lenner, P., Lindahl, B., Hallmans, G., and Kaaks, R., *Prospective study of hyperglycemia and cancer risk.* Diabetes Care, 2007. 30(3): p. 561-567.
  201. Stumvoll, M., Goldstein, B. J., and van Haeften, T. W., *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy.* Lancet, 2005. 365(9467): p. 1333-1346.
  202. Suh, E. K. and Gumbiner, B. M., *Translocation of beta-catenin into the nucleus independent of interactions with FG-rich nucleoporins.* Exp Cell Res, 2003. 290(2): p. 447-456.
  203. Suzuki, A., Ozono, K., Kubota, T., Kondou, H., Tachikawa, K., and Michigami, T., *PTH/cAMP/PKA signaling facilitates canonical Wnt signaling via inactivation of glycogen synthase kinase-3beta in osteoblastic Saos-2 cells.* J Cell Biochem, 2008. 104(1): p. 304-317.
  204. Tamai, K., Zeng, X., Liu, C., Zhang, X., Harada, Y., Chang, Z., and He, X., *A mechanism for Wnt coreceptor activation.* Mol Cell, 2004. 13(1): p. 149-156.
  205. Taurin, S., Sandbo, N., Qin, Y., Browning, D., and Dulin, N. O., *Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase.* J Biol Chem, 2006. 281(15): p. 9971-9976.



206. Tennant, D. A., Duran, R. V., and Gottlieb, E., *Targeting metabolic transformation for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2010. 10(4): p. 267-277.
207. Tetsu, O. and McCormick, F., *Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells*. Nature, 1999. 398(6726): p. 422-426.
208. Thornton, T. M., Pedraza-Alva, G., Deng, B., Wood, C. D., Aronshtam, A., Clements, J. L., Sabio, G., Davis, R. J., Matthews, D. E., Doble, B., and Rincon, M., *Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation*. Science, 2008. 320(5876): p. 667-670.
209. Tian, E., Zhan, F., Walker, R., Rasmussen, E., Ma, Y., Barlogie, B., and Shaughnessy, J. D., Jr., *The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma*. N Engl J Med, 2003. 349(26): p. 2483-2494.
210. Toft-Nielsen, M. B., Damholt, M. B., Madsbad, S., Hilsted, L. M., Hughes, T. E., Michelsen, B. K., and Holst, J. J., *Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. 86(8): p. 3717-3723.
211. Towle, H. C., *Glucose and cAMP: adversaries in the regulation of hepatic gene expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(24): p. 13476-13478.
212. Travis, A., Amsterdam, A., Belanger, C., and Grosschedl, R., *LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function [corrected]*. Genes Dev, 1991. 5(5): p. 880-894.
213. Unger, R. H. and Eisentraut, A. M., *Entero-insular axis*. Arch Intern Med, 1969. 123(3): p. 261-266.
214. Uttenthal, L. O. and Blazquez, E., *Characterization of high-affinity receptors for truncated glucagon-like peptide-1 in rat gastric glands*. FEBS Lett, 1990. 262(1): p. 139-141.
215. Van de Wetering, M., Castrop, J., Korinek, V., and Clevers, H., *Extensive alternative splicing and dual promoter usage generate Tcf-1 protein isoforms with differential transcription control properties*. Mol Cell Biol, 1996. 16(3): p. 745-752.
216. van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A. P., Tjon-Pon-Fong, M., Moerer, P., van den Born, M., Soete, G., Pals, S., Eilers, M., Medema, R., and Clevers, H., *The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells*. Cell, 2002. 111(2): p. 241-250.
217. van Es, J. H., Jay, P., Gregorieff, A., van Gijn, M. E., Jonkheer, S., Hatzis, P., Thiele, A., van den Born, M., Begthel, H., Brabletz, T., Taketo, M. M., and Clevers, H., *Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts*. Nat Cell Biol, 2005. 7(4): p. 381-386.
218. Vigneri, P., Frasca, F., Sciacca, L., Pandini, G., and Vigneri, R., *Diabetes and cancer*. Endocr Relat Cancer, 2009. 16(4): p. 1103-1123.
219. Vilsboll, T. and Holst, J. J., *Incretins, insulin secretion and Type 2 diabetes mellitus*. Diabetologia, 2004. 47(3): p. 357-366.
220. Vilsboll, T., Krarup, T., Sonne, J., Madsbad, S., Volund, A., Juul, A. G., and Holst, J. J., *Incretin secretion in relation to meal size and body weight in healthy subjects and*

- people with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. 88(6): p. 2706-2713.
221. Walde, S. and Kehlenbach, R. H., *The Part and the Whole: functions of nucleoporins in nucleocytoplasmic transport*. *Trends Cell Biol*, 2010. 20(8): p. 461-469.
222. Waltzer, L. and Bienz, M., *Drosophila CBP represses the transcription factor TCF to antagonize Wingless signalling*. *Nature*, 1998. 395(6701): p. 521-525.
223. Wallingford, J. B. and Habas, R., *The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity*. *Development*, 2005. 132(20): p. 4421-4436.
224. Wang, H. Y. and Malbon, C. C., *Wnt-frizzled signaling to G-protein-coupled effectors*. *Cell Mol Life Sci*, 2004. 61(1): p. 69-75.
225. Wang, M. and Drucker, D. J., *The LIM domain homeobox gene isl-1 is a positive regulator of islet cell-specific proglucagon gene transcription*. *J Biol Chem*, 1995. 270(21): p. 12646-12652.
226. Wang, Y., Macke, J. P., Abella, B. S., Andreasson, K., Worley, P., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Nathans, J., *A large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the Drosophila tissue polarity gene frizzled*. *J Biol Chem*, 1996. 271(8): p. 4468-4476.
227. Warburg, O., *On the origin of cancer cells*. *Science*, 1956. 123(3191): p. 309-314.
228. Waterman, M. L., *Expression of lymphoid enhancer factor/T-cell factor proteins in colon cancer*. *Curr Opin Gastroenterol*, 2002. 18(1): p. 53-59.
229. Waterman, M. L., *Lymphoid enhancer factor/T cell factor expression in colorectal cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 2004. 23(1-2): p. 41-52.
230. Wei, Y. and Mojsov, S., *Tissue-specific expression of the human receptor for glucagon-like peptide-I: brain, heart and pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences*. *FEBS Lett*, 1995. 358(3): p. 219-224.
231. Welters, H. J. and Kulkarni, R. N., *Wnt signaling: relevance to beta-cell biology and diabetes*. *Trends Endocrinol Metab*, 2008. 19(10): p. 349-355.
232. Wettergren, A., Schjoldager, B., Mortensen, P. E., Myhre, J., Christiansen, J., and Holst, J. J., *Truncated GLP-1 (proglucagon 78-107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man*. *Dig Dis Sci*, 1993. 38(4): p. 665-673.
233. Widenmaier, S. B., Sampaio, A. V., Underhill, T. M., and McIntosh, C. H., *Noncanonical activation of Akt/protein kinase B in  $\beta$ -cells by the incretin hormone glucose-dependent insulinotropic polypeptide*. *J Biol Chem*, 2009. 284(16): p. 10764-10773.
234. Wielenga, V. J., Smits, R., Korinek, V., Smit, L., Kielman, M., Fodde, R., Clevers, H., and Pals, S. T., *Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway*. *Am J Pathol*, 1999. 154(2): p. 515-523.
235. Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., and King, H., *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030*. *Diabetes Care*, 2004. 27(5): p. 1047-1053.

236. Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., Yates, J. R., 3rd, and Nusse, R., *Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors*. Nature, 2003. 423(6938): p. 448-452.
237. Wolf, D., Rodova, M., Miska, E. A., Calvet, J. P., and Kouzarides, T., *Acetylation of beta-catenin by CREB-binding protein (CBP)*. J Biol Chem, 2002. 277(28): p. 25562-25567.
238. Wolin, K. Y. and Tuchman, H., *Physical activity and gastrointestinal cancer prevention*. Recent Results Cancer Res, 2011. 186: p. 73-100.
239. Wong, H. P., Yu, L., Lam, E. K., Tai, E. K., Wu, W. K., and Cho, C. H., *Nicotine promotes colon tumor growth and angiogenesis through beta-adrenergic activation*. Toxicol Sci, 2007. 97(2): p. 279-287.
240. Xie, D., Zhong, Q., Ding, K. H., Cheng, H., Williams, S., Correa, D., Bollag, W. B., Bollag, R. J., Insogna, K., Troiano, N., Coady, C., Hamrick, M., and Isales, C. M., *Glucose-dependent insulintropic peptide-overexpressing transgenic mice have increased bone mass*. Bone, 2007. 40(5): p. 1352-1360.
241. Xu, W. and Kimelman, D., *Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding partners*. J Cell Sci, 2007. 120(Pt 19): p. 3337-3344.
242. Yamada, Y. and Seino, Y., *Physiology of GIP--a lesson from GIP receptor knockout mice*. Horm Metab Res, 2004. 36(11-12): p. 771-774.
243. Yi, F., Brubaker, P. L., and Jin, T., *TCF-4 mediates cell type-specific regulation of proglucagon gene expression by beta-catenin and glycogen synthase kinase-3beta*. J Biol Chem, 2005. 280(2): p. 1457-1464.
244. Yi, F., Sun, J., Lim, G. E., Fantus, I. G., Brubaker, P. L., and Jin, T., *Cross talk between the insulin and Wnt signaling pathways: evidence from intestinal endocrine L cells*. Endocrinology, 2008. 149(5): p. 2341-2351.
245. Yip, R. G. and Wolfe, M. M., *GIP biology and fat metabolism*. Life Sci, 2000. 66(2): p. 91-103.
246. Yokoya, F., Imamoto, N., Tachibana, T., and Yoneda, Y., *beta-catenin can be transported into the nucleus in a Ran-unassisted manner*. Mol Biol Cell, 1999. 10(4): p. 1119-1131.
247. Yu, M., Moreno, C., Hoagland, K. M., Dahly, A., Ditter, K., Mistry, M., and Roman, R. J., *Antihypertensive effect of glucagon-like peptide 1 in Dahl salt-sensitive rats*. J Hypertens, 2003. 21(6): p. 1125-1135.
248. Yuan, P., Chen, G., and Manji, H. K., *Lithium activates the c-Jun NH2-terminal kinases in vitro and in the CNS in vivo*. J Neurochem, 1999. 73(6): p. 2299-2309.
249. Yun, M. S., Kim, S. E., Jeon, S. H., Lee, J. S., and Choi, K. Y., *Both ERK and Wnt/beta-catenin pathways are involved in Wnt3a-induced proliferation*. J Cell Sci, 2005. 118(Pt 2): p. 313-322.
250. Zeng, X., Tamai, K., Doble, B., Li, S., Huang, H., Habas, R., Okamura, H., Woodgett, J., and He, X., *A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation*. Nature, 2005. 438(7069): p. 873-877.
251. Zhang, F., Phiel, C. J., Spece, L., Gurvich, N., and Klein, P. S., *Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in response to lithium. Evidence for autoregulation of GSK-3*. J Biol Chem, 2003. 278(35): p. 33067-33077.



- 252. Zhang, X., Gaspard, J. P., and Chung, D. C., *Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia*. Cancer Res, 2001. 61(16): p. 6050-6054.
- 253. Zhou, P., Byrne, C., Jacobs, J., and Fuchs, E., *Lymphoid enhancer factor 1 directs hair follicle patterning and epithelial cell fate*. Genes Dev, 1995. 9(6): p. 700-713.
- 254. Zoncu, R., Efeyan, A., and Sabatini, D. M., *mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. 12(1): p. 21-35.



*Anexo*



### Otros trabajos publicados durante la realización de esta Tesis:

- **Chocarro-Calvo A.**, Zaballos MA, Santisteban P, García-Jiménez C. 2012. DARPP-32 is required for MAPK/ERK signaling in thyroid cells. *Mol. Endocrinol.*; 26(3). *ISSN: 1944-9917*.

### Además los resultados de esta Tesis han sido parcialmente recogidos en la siguiente revisión:

- García-Jiménez C. Wnt and incretin connections. *Vitam Horm.* 2010; 84:355-87. Review. *ISSN: 0083-6729*.

### Los resultados de esta Tesis han sido presentados en las siguientes reuniones científicas:

- **Chocarro-Calvo A**, García-Martínez JM y García-Jiménez C. Glucose induces gastric inhibitory peptide (GIP) gene expression and not only its secretion. 4th International Congress on Prediabetes and the Metabolic Syndrome. Madrid. 2011. Poster. *J. Diabetes.* 2011; 3(Issue Supplement s1): 261. *ISSN: 1753-0407*.
- García-Martínez JM, **Chocarro-Calvo A** y García-Jiménez C. Hyperinsulinemia may enhance gastric inhibitory peptide (GIP) production in hyperglycaemic conditions. 4th International Congress on Prediabetes and the Metabolic Syndrome. Madrid. 2011. Poster. *J. Diabetes.* 2011; 3(Issue Supplement s1): 261. *ISSN: 1753-0407*.
- **Chocarro-Calvo A**, García-Martínez JM y García-Jiménez C. La glucosa es necesaria para la inducción del péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) por WNT. 52º Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología (SEEN). Salamanca. 2010. Comunicación Oral. *Endocrinol. Nutr.* 2010; 57 (Esp. congreso): 18. *ISSN: 1575-0922*.
- García-Martínez JM, **Chocarro-Calvo A** y García-Jiménez C. La expresión del péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) se induce sinérgicamente por insulina y glucosa en células enteroendocrinas. 52º Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología (SEEN). Salamanca. 2010. Comunicación Oral. *Endocrinol. Nutr.* 2010; 57 (Esp. congreso): 18. *ISSN: 1575-0922*.

- García-Martínez JM, **Chocarro-Calvo A** y García-Jiménez C. La insulina induce la expresión del péptido insulíntrópico dependiente de glucosa (GIP) en células enteroendocrinas usando los efectores de la vía Wnt. XXXII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Oviedo. 2009. Poster.
- **Chocarro-Calvo A**, García-Martínez JM y García-Jiménez C. La expresión del péptido insulíntrópico dependiente de glucosa (GIP) se induce sinérgicamente por insulina y glucosa en células enteroendocrinas. 51º Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología (SEEN). Zaragoza 2009. Comunicación Oral.  
*Endocrinol. Nutr.* 2009; 56 (Espec. Cong.): 7. *ISSN: 1575-0922*.
- García-Martínez J.M; **Chocarro-Calvo A.**; García-Jiménez C. Transcriptional regulation of glucose dependent insulíntrópico peptide. International Congress of Endocrinology 2008 (ICE 2008). Río de Janeiro, Brasil. 2008. Poster  
*Endocrinología & Metabología.* 2008; 52(6) Parte II: 926-7. *ISSN: 0004-2730*.
- **Chocarro-Calvo A**, García-Martínez JM y García-Jiménez C. Regulación de la expresión de GLP-1 en células enteroendocrinas por suero y glucosa. 50º Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología. Bilbao. 2008. Poster.  
*Endocrinol. Nutr.* 2008; 55 Monografía 5: 15. *ISSN: 1575-0922*.

## DARPP-32 Is Required for MAPK/ERK Signaling in Thyroid Cells

Ana Chocarro-Calvo,\* Miguel A. Zaballos,\* Pilar Santisteban,  
and Custodia García-Jiménez

Facultad de Ciencias de la Salud (A.C.-C., C.G.-J.), Universidad Rey Juan Carlos, Alcorcón, 28922 Madrid, Spain; and Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" (M.A.Z., P.S.), Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

Modulation of MAPK signaling duration by cAMP defines its physiological output by driving cells toward proliferation or differentiation. Understanding how the kinetics of MAPK signaling are integrated with other cellular signals is a key issue in development and cancer. Here we show that dopamine and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein, 32 kDa (DARPP-32), a protein required for thyroid cell differentiation, determines whether MAPK/ERK activation is sustained or transient. Serum, a stimulus that activates MAPK signaling and does not independently increase DARPP-32 levels results in transient activation of the MAPK pathway. By contrast, TSH + (IGF-I) activate MAPK signaling but also independently increase DARPP-32 levels. Our results are consistent with a model in which maintenance of DARPP-32 expression by TSH + IGF-I leads to sustained MAPK signaling. Moreover, the sensitivity of MAPK/ERK signaling in thyroid cells is lost when *de novo* DARPP-32 expression is blocked by small interfering RNA. Because both DARPP-32 levels and function as inhibitor of protein phosphatase 1, a key inhibitor of MAPK kinase activity, are governed by cAMP/protein kinase A, the results may explain why in thyroid cells cAMP signaling downstream from TSH controls the duration of MAPK pathway activity. Thus, fine-tuning of DARPP-32 levels leads to changes in the kinetics or sensitivity of MAPK/ERK signaling. Given the implications of MAPK signaling in thyroid cancer and the loss of DARPP-32 in tumor and transformed thyroid cells, DARPP-32 may represent a key therapeutic target. (*Molecular Endocrinology* 26: 0000–0000, 2012)

The output signal of the MAPK cascade depends on three parameters: the time delay between stimulus and response, the amplitude gain, and the duration of the output signal. The time delay is a robust characteristic, signal amplitude is most sensitive to phosphatases acting on ERK, and signal duration is sensitive only to phosphatase activity toward MAPK kinase (MEK) (1). The duration of MEK/ERK activation-transient *vs.* sustained results in opposite physiological cellular outcomes such as proliferation or differentiation, depending on the cell type (2, 3). Sustained MEK/ERK activation must not be confounded with constitutive activation, which has been linked to cancer in thyroid and other cells. Constitutive activation of the MEK/ERK pathway is observed in a

high percentage of aggressive thyroid cancers due to activating mutations in BRAF (mainly V600E), the main kinase that activates MEK (reviewed in Refs. 4 and 5). The high frequency of B-RAF mutations in thyroid cancer has focused attention toward cAMP intermediaries that may regulate/interact with BRAF.

Remarkably, cAMP and ERK cooperate in some cells to promote and maintain differentiation, whereas in other cells cAMP antagonizes ERK activity; in thyroid cells, combined stimulation of cAMP and ERK signaling promotes both proliferation and differentiation, depending on the stimuli (6). Potentiation or blockade of ERK activity by cAMP has been attributed to high or low expression of BRAF, to cAMP-Rap1-mediated activation of BRAF

ISSN Print 0888-8809 ISSN Online 1944-9917

Printed in U.S.A.

Copyright © 2012 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/me.2011-1309 Received November 2, 2011. Accepted December 30, 2011.

\* A.C.-C. and M.A.Z. contributed equally to this work.

Abbreviations: DARPP-32, Dopamine and cAMP regulated neuronal phosphoprotein, 32 kDa; 4H, four hormone medium; 6H, six-hormone mixture; MEK, MAPK kinase; NIS, sodium iodide symporter; p, phosphorylated; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PKA, protein kinase A; PP1, phosphatase 1; RSK, ribosomal kinase; siRNA, small interfering RNA.



(7), or to a combination of protein kinase A (PKA)-dependent and -independent mechanisms, (8, 9). Other intermediaries such as scaffolding proteins have become increasingly recognized as being important to ensure specificity and to remodel the kinetics of interactions and activation. For example, the A kinase anchor protein Lbc directs PKA phosphorylation of the MAPK pathway scaffolding component kinase suppressor of Ras-1 to guaranteeing maximized MEK/ERK signaling efficiency (10, 11). Thus, the upstream intermediaries that may mediate cross talk between cAMP and MEK/ERK are being extensively examined, whereas downstream mechanisms have been largely neglected.

One potential downstream mechanism for achieving sustained MAPK/ERK activation might be the inhibition of protein phosphatase 1 (PP1) and protein phosphatase 2A, which inactivate MEK (12–15). The elucidating mechanisms that control their activity is a key issue.

The PP1 inhibitor dopamine and cAMP regulated neuronal phosphoprotein, 32 kDa (DARPP-32) controls ERK activation in ventral, but not dorsal, striatum (16–19) and is a candidate that may link the cAMP and MAPK/ERK pathways in thyroid cells. Amplification of the cAMP pathway is achieved by PKA-dependent phosphorylation of DARPP-32 at Threo 34 that enables DARPP-32 to potently inhibit PP1 (20, 21). As a consequence, those substrates phosphorylated via cAMP/PKA and dephosphorylated by PP1 will remain in the phosphorylated state for longer if DARPP-32 is present. Because MEK can be inactivated by PP1, and PP1 is inhibited by cAMP-driven phosphorylation of DARPP-32, we tested the hypothesis that DARPP-32 controls the duration (and outcome) of MEK/ERK signaling in thyroid cells in which TSH signaling via cAMP/PKA and IGF-I via phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt induce DARPP-32 accumulation and its phosphorylation at Threo34 (22). Our results are consistent with DARPP-32 playing a key role in regulating the duration and sensitivity of MAPK signaling in thyroid cells.

## Materials and Methods

### Cell culture

Cell lines used in this work were rat differentiated PCCL3 (kindly provided by Dr. A. Fusco, Università degli Studi di Napoli Federico II, Naples Italy) and FRTL-5 (ATCC CRL 8305; American Type Culture Collection, Manassas, VA). Ha-ras- and K-ras-transformed FRTL-5 cells (50) were used as undifferentiated thyroid cells. Cells were cultured in Coon's modified Ham's F-12 medium supplemented with 5% donor calf serum, glutamine, antibiotics, and a six-hormone (6H) mixture (1 nM thyrotropin, 10 µg/ml insulin, 10 ng/ml somatostatin, 10 µg/ml

transferin, 10 nM hydrocortisone, and 10 ng/ml glycyl-L-histidyl-L-lysine acetate). The effect of TSH, IGF-I, and serum was studied by starving nearly confluent cells of thyrotropin, insulin/IGF-I, and serum (0.1%) for 7–9 d (4H medium). TSH (1 nM) and/or IGF-I (100 ng/ml) was added for 24 h. Inhibitors (when used) were added to the cells 30 min before addition of thyrotropin or IGF-I at the concentration of 10 mM in both cases (both from Calbiochem, La Jolla, CA) and maintained for the indicated times. Appropriated controls were established. Tissue culture media and bovine TSH were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). IGF-I was obtained from Peprotech (Rocky Hill, NJ). Donor calf serum was purchased from Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD). The medium was changed every 2 d.

### Retroviral vector and gene transfer

A pBABE-neo plasmid with a cDNA encoding a mutant version of MEK (S>A) was kindly donated by Dr. C. Marshall (Cancer Research UK Centre for Cell and Molecular Biology, London, UK) (see Ref. 51), and we obtained it from Dr. Colin Goding (Oxford University, Oxford, UK). The pBABE-MEK (S>A) plasmid was transfected into the Omega E ecotropic packaging line. These cells were grown over confluent without serum to increase viral production in supernatants.

### Retroviral gene transfer

Supernatants were used for retroviral infection of PCCL3 cells, seeded at  $1.5 \times 10^6$  in 9-cm dishes. Infection lasted 5 h and cells were allowed to recover for 48 h in complete medium before adding puromycin. Resistant clones were picked, propagated, and checked for MEK mutant expression.

### RNA extraction and Northern blot analysis

Total RNA was isolated by the guanidinium-thiocyanate-phenol method (52) from the indicated cell lines or tissues after the indicated treatments. Total RNA (20 µg) was separated in 1% agarose gels containing 2.2 M formaldehyde. RNA was blotted onto Nytran filters (Schleicher & Schuell, Keene, NH) as suggested by the manufacturer. Methylene blue staining of the blots revealed the integrity of the RNA and the presence of equal amounts in each lane. Hybridization and washing were carried out with a rat cDNA DARPP-32-specific probe kindly donated by Dr. P. Greengard (Laboratory of Molecular and Cellular Neuroscience, Rockefeller University, New York, NY) and labeled by random oligo priming.

### Quantitative RT-PCR

We reverse transcribed 100 ng to 1 µg total RNA and amplified it 40 times in a Stratagene Mx 3000P System (La Jolla, CA; 10 min at 95 °C, 30 sec at 95 °C, 1 min at 59 °C, and 25 sec at 72 °C). Quantitative PCR were normalized using β-glucuronidase as standard with carboxy-X-rhodamine as reference dye.

We used a SYBR Green PCR kit (Stratagene,) and forward primer, 5'-CACCCAAAGTCTGAAGAGACCCA-3', and reverse primer, 5'-AGGTTGCTGATGGTCTGCAGGT-3'.

### Protein extraction, Western blot, and immunodetection

Total protein extracts were obtained by scraping the cells in radioimmunoprecipitation assay buffer [PBS 1% (vol/vol),



Nonidet 0.5% (wt/vol), sodium deoxycholate 0.1% (wt/vol), sodium dodecyl sulfate]. Protein extracts (20  $\mu$ g) were separated in 6–12% SDS-PAGE gels and immunodetected after Western blotting. Anti-total DARPP-32, antiphosphorylated (p) ribosomal kinase (RSK)<sup>p90</sup>, and anti-pMEK from Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA), anti-Rsk, anti- $\beta$ -actin, anti-Akt1/2, and anti-ERK 2 were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA); anti-pAkt (pSer472/473/474) from Pharmingen (San Diego, CA); anti-pMAPK 1/2 from Upstate (Billerica, MA); and antitubulin from Sigma. Antisodium iodide symporter (NIS) antibody was a gift from Dr. Nancy Carrasco (Albert Einstein College of Medicine, New York, NY). Secondary antibodies were horseradish peroxidase conjugated and detected by autoradiography or alkaline phosphatase conjugated and analyzed in a Typhoon imaging analyzer 9210 (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Equal protein loading was first monitored by Bradford assays and after transfer by detection of the nonregulated proteins,  $\beta$ -actin, total ERK, and total Rsk.

### RNA interference

DARPP-32 small interfering RNA (siRNA) oligoribonucleotides with sequences r(CCCCUGCCUUGCUGUCCG)d(TT) and r(CGGAACAGCAAGGCAGGGG)d(TT) and control siRNA oligonucleotides with sequences r(UUCUCCGAACGUGUCACG U)d(TT) and r(ACGUGACACGUUCGGAGAA)d(TT) were purchased from QIAGEN (Chatsworth, CA) and annealed according to manufacturer's instructions. siRNA, either control or

DARPP-32 specific, were transfected into PCCL3 cells (plated in six well plates at  $6 \times 10^4$  cells/well the previous day) using INTERFERinTM PolyPlus reagent (Genycell Biotech, Santa Fe, Granada, Spain) and following the manufacturer's instructions. After 2 d thyrotropin (1 nM) and IGF-I (100 ng/ml) were added for 10 min or 24 h and collected to analyze by Western blotting.

### Statistical analysis

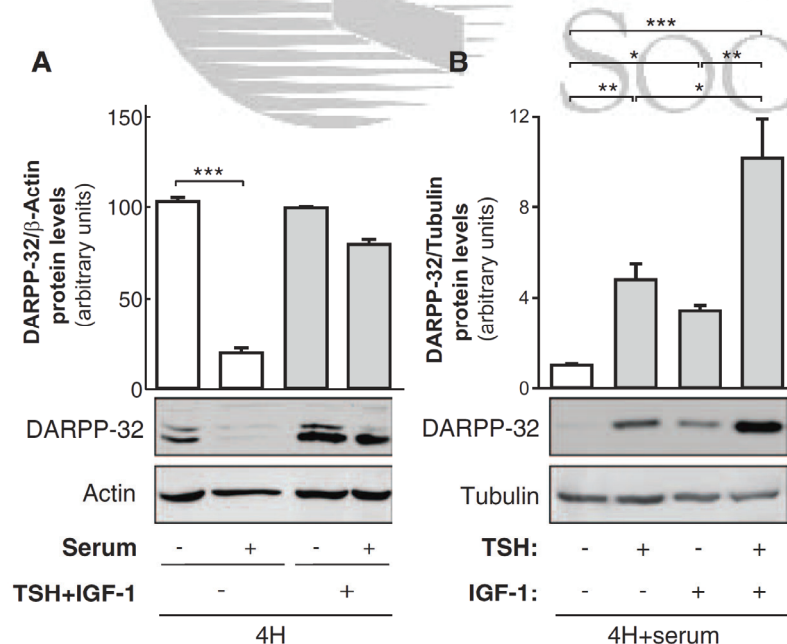
Results are presented as fold induction, mean  $\pm$  SEM, from three biological replicas of Western blots and RT-PCR. Tests for significance between two sample groups were performed with a Student's *t* test. For multiple comparisons, ANOVA was used. Differences were considered statistically significant if  $P < 0.05$ .

## Results

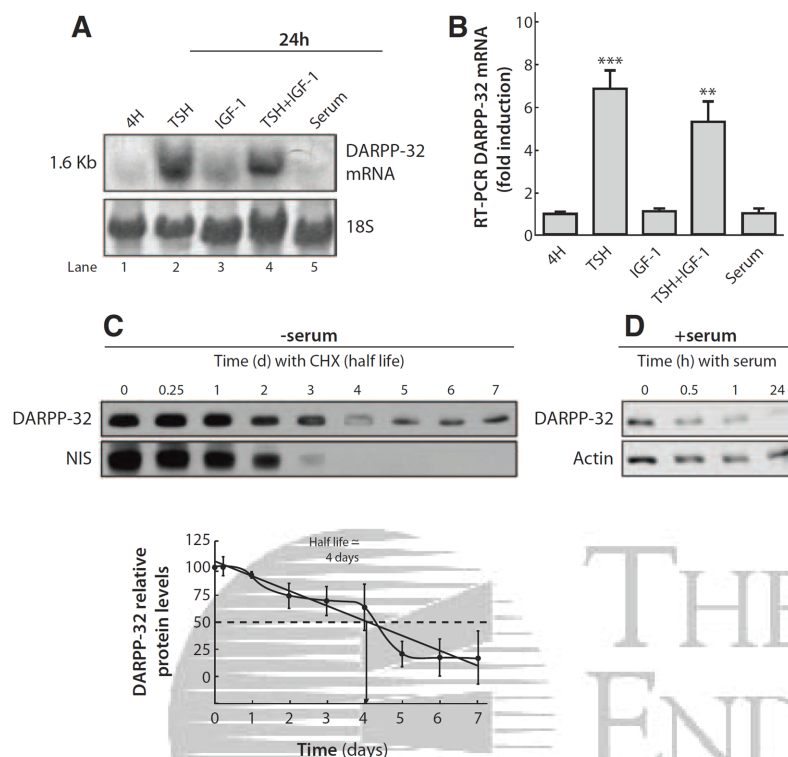
### Serum depletes DARPP-32 protein

PCCL3 thyroid cells cultured in 4H medium, which contains somatostatin, transferin, hydrocortisone, and glycyl-L-histidyl-L-lysine acetate and lacks TSH and insulin/IGF-I and serum (only 0.1% is present, see *Materials and Methods*) arrest quiescent at G<sub>0</sub>, retain low (basal) DARPP-32 levels, and do not express final differentiation markers such as thyroglobulin and NIS (22). By contrast,

thyrocytes cultured in a standard basic 4H medium supplemented with 5% serum, TSH, and IGF-I (6H medium) undergo proliferation compatible with differentiation (23–25) and express high levels of DARPP-32 (22). Addition of only serum to the 4H medium supports proliferation (26) (García-Jiménez, C., unpublished observations) but not differentiation of thyrocytes and substantially decreases DARPP-32 protein levels (Fig. 1A, lanes 1 and 2). By contrast, serum addition to cells that are grown in the presence of TSH and IGF-I (or simultaneous addition of the three) maintains high DARPP-32 levels (Fig. 1A, lanes 3 and 4), suggesting that in growing differentiated thyrocytes, the negative regulation of DARPP-32 by serum is counteracted by TSH and IGF-I. This is consistent with our previous work showing that DARPP-32 is required for differentiation (22). Addition of TSH alone to cells cultured in 4H medium plus 5% serum partially restored DARPP-32 protein levels, whereas addition of IGF-I alone provided a smaller increase in DARPP-32. When added together,



**FIG. 1.** Serum depletes DARPP-32 protein in the absence but not in the presence of TSH and IGF-I with Western blots. A, PCCL3 cells were cultured for 7 d in 4H medium (without serum, TSH, and IGF-I) and serum was added for 24 h before harvesting. Alternatively, cells growing in the presence of TSH+IGF-I were treated with serum or not for 24 h. B, Thyroid cells cultured in 4H medium containing serum have undetectable DARPP-32 levels and addition of TSH or IGF-I for 24 h rescues DARPP-32 protein levels to different degrees. The effects of TSH+IGF-I on DARPP-32 protein levels are cooperative. The results in A and B represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments each. \*\*\*,  $P < 0.001$ , \*\*,  $P < 0.01$ , \*,  $P < 0.05$  by Student *t* test.



**FIG. 2.** Serum promotes DARPP-32 protein degradation but does not alter DARPP-32 mRNA in PCCL3 thyroid cells. **A**, Representative Northern blot. The mRNA for DARPP-32 accumulates in response to TSH. IGF-I induced a minor increase in DARPP-32 mRNA and did not cooperate with TSH. Serum did not change DARPP-32 mRNA levels. A probe for 18S RNA was used as a loading control (*bottom panel*). **B**, RT-PCR and statistical analysis. TSH alone or in combination with IGF-I induced a 6- to 8-fold increase in DARPP-32 mRNA levels and IGF-I or serum did not significantly change the mRNA levels; all treatments were for 24 h. Values were normalized to the endogenous control (18S) and refer to fold induction over the untreated control cells. Values represent mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). \*\*,  $P < 0.01$  and \*\*\*,  $P < 0.001$  by Student *t* test. **C**, In the absence of serum, DARPP-32 protein is very stable. Cycloheximide (5 mM) was added, and the levels of DARPP-32 protein were measured over time, in days in three independent experiments to determine its half-life. *Upper panel*, Representative Western blot. *Lower panel*, Statistical analysis. Values represent mean  $\pm$  SD. **D**, Serum promotes DARPP-32 protein degradation. Serum addition to a 4H medium reduces the time for DARPP-32 depletion to hours instead of days. The Western blotting shows a time course of serum dependent DARPP-32 depletion during which time is expressed in hours;  $\beta$ -actin was used as a loading control.

TSH and IGF-I cooperated to increase the levels of DARPP-32 protein (Fig. 1B). Furthermore, it takes at least 7 d of serum, TSH, and IGF-I starvation for thyroid cells to reach minimal (basal) DARPP-32 levels in culture (data not shown). In contrast, serum addition depletes DARPP-32 protein stocks within 24 h.

#### Serum-dependent DARPP-32 depletion occurs via protein degradation

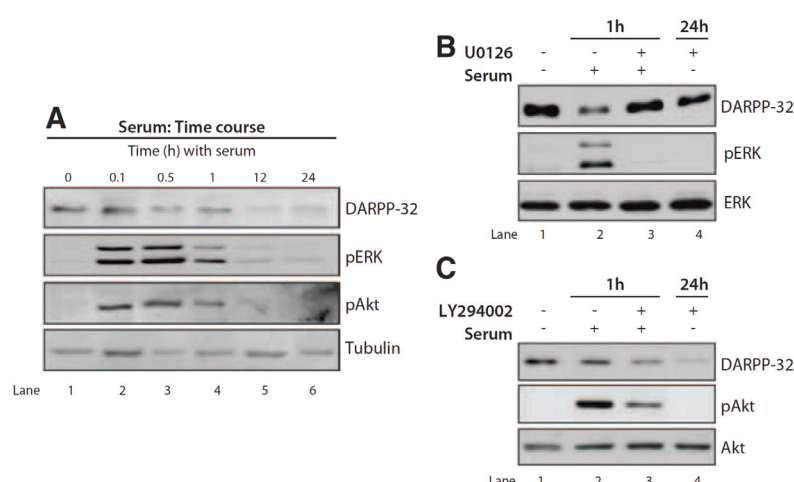
Serum-dependent DARPP-32 protein depletion may occur via protein degradation or decreased RNA transcription or stability. To distinguish between these two possibilities, we quantified DARPP-32 mRNA levels in cells cultured in the absence or presence of serum, TSH,

and/or IGF-I. The Northern blot in Fig. 2A shows that DARPP-32 mRNA levels are almost undetectable in quiescent cells cultured for 7 d without TSH, IGF-I, and serum, (4H, Fig. 2, lane 1). Treatment for 24 h with TSH (Fig. 2, lane 2) increases DARPP-32 mRNA substantially, whereas IGF-I (Fig. 2, lane 3) resulted in a small increase in DARPP-32 mRNA levels that was not significant when the 18S loading control was taken into account. Serum (Fig. 2, lane 5) did not modify DARPP-32 mRNA levels, and combined TSH+IGF-I treatment did not increase DARPP-32 mRNA levels beyond those observed using TSH alone (Fig. 2, lane 4). Statistical analysis of RT/PCR experiments (Fig. 2B) confirmed the results from the Northern blot. These data indicate that because serum does not affect DARPP-32 mRNA levels, the serum-dependent DARPP-32 depletion is most likely exerted at the protein level. Moreover, because IGF-I does not alter DARPP-32 mRNA expression but increases protein levels and synergize with TSH in inducing DARPP-32 protein levels, as documented in Fig. 1B, we may conclude that TSH increases DARPP-32 mRNA levels, whereas IGF-I increases DARPP-32 protein levels posttranscriptionally.

By contrast, serum addition for 24 h does not modify basal DARPP-32 mRNA levels, suggesting that the serum-dependent DARPP-32 depletion documented in Fig. 1A occurs via protein degradation. We therefore measured the half-life of DARPP-32 protein after incubation of thyroid cells with cycloheximide to inhibit *de novo* protein synthesis and quantified the remaining DARPP-32 levels over time. We used the thyroid-specific protein NIS as a control of a long-lived thyroid protein (27). The results (Fig. 2C) indicate that the half-life of DARPP-32 was in the order of 4 d.

By contrast, serum addition to 4H medium promoted a 50% reduction of DARPP-32 levels in the first hour and loss of expression by 24 h (Fig. 2D). Thus, serum depletes DARPP-32 levels inducing degradation of preexisting protein stocks. Because TSH plus IGF-I induce DARPP-32 accumulation (Figs. 1 and 2), under normal culture condi-





**FIG. 3.** Serum-dependent DARPP-32 depletion occurs via MEK/ERK activation and not via PI3K activation. PCCL3 cells were cultured in 4H medium for 5–7 d before adding serum for the indicated times before Western blotting with indicated antibodies. **A**, Serum-dependent DARPP-32 depletion occurs within 30 min. Both ERK and Akt are transiently activated by serum and the peak of activation goes from 5 min to 1 h. **B**, MEK inhibitor U0126 added to PCCL3 cultured in 4H medium cells 30 min before serum resulted in blocked serum-dependent DARPP-32 depletion. **C**, PI3K inhibitor LY294002 added to PCCL3 cells cultured in 4H medium 30 min before serum does not alter serum-dependent DARPP-32 depletion.

tions in 6H medium, DARPP-32 degradation triggered by serum is constantly compensated by TSH and IGF-I-induced *de novo* synthesis. Thus, in 6H medium that includes serum, TSH and IGF-I, DARPP-32 is expressed but rapidly turned over.

### Serum-dependent DARPP-32 depletion is mediated by MEK/ERK activation

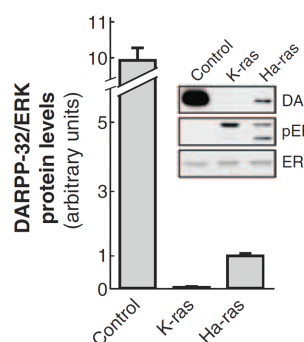
Serum promotes proliferation of thyrocytes (24, 28) and in other systems activates MAPK/ERK and PI3K signaling pathways (29–31). The time course in Fig. 3A shows a ERK and Akt activation before DARPP-32 depletion, suggesting that activation of these pathways may cause DARPP-32 depletion. To elucidate whether serum-dependent DARPP-32 depletion relies on any of these pathways, we used specific inhibitors and analyzed serum effects on DARPP-32 levels under these conditions. Specific inhibition of the MAPK/MEK/ERK pathway with U0126 suppresses serum-dependent DARPP-32 depletion and restores basal levels (Fig. 3B, lanes 2 and 3). Addition of U0126 alone for 24 h did not alter DARPP-32 levels in thyrocytes cultured in 4H medium (Fig. 3B, lane 4). By contrast, blocking PI3K activity with LY294002 reproducibly reduced DARPP-32 levels by 40–60% (Fig. 3C, lane 4) suggesting that LY294002 interferes with protein stability. Phospho-AKT was used as a readout of PI3K signaling. However, PI3K inhibition by LY294002 does not prevent the serum-dependent reduction in DARPP-32 levels (Fig. 3C, lanes 2 and 3). Thus, we con-

cluded that serum-induced transient activation of MAPK/ERK promotes DARPP-32 depletion.

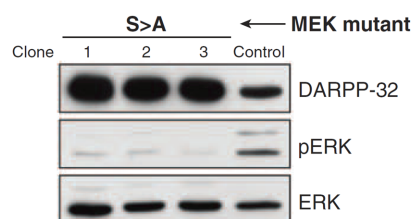
### MEK signaling down-regulates DARPP-32

We have previously reported that FRTL-5 thyroid cell lines stably expressing *Ras* mutants were severely (*Ha-Ras*) or totally (*K-Ras*) depleted of DARPP-32 mRNA and protein (22). Similar to serum, *Ras* signals via the MAPK and PI3K pathways and given that serum depletes DARPP-32 through MAPK/ERK activation (Fig. 3), we asked how MAPK activity correlates with DARPP-32 levels in *Ras*-transformed cell lines. Figure 4A shows that DARPP-32 levels inversely correlate with ERK activity: *Ha-ras* transformed thyroid cells exhibit moderate ERK activity (shown as p42 and p44-ERK1/2 phosphorylation) and low but detectable DARPP-32 levels. By contrast, *K-ras*-transformed thyroid cells showed high p44 ERK activity and were completely devoid of DARPP-32 (Fig. 4A). To further substantiate the cause-effect relationship between MEK/ERK activity and DARPP-32 depletion, we made stable cell lines overexpressing a kinase-dead mutant form of MEK (S>A). Consistent with previous results showing MEK/ERK-dependent DARPP-32 depletion in thyroid cells, inactivation of MEK led to DARPP-32 accumulation (Fig. 4B). All MEK S>A clones grew extremely slowly (not shown) and expressed 4-fold higher DARPP-32 levels than normally growing thyroid cells (control), in which levels are already high (Fig. 4B). Thus, MEK/ERK activation by serum or *Ras* transformation leads to DARPP-32 depletion, and, vice versa, MEK inactivation as in the S>A mutant leads to DARPP-32 accumulation. Given that the clones grow extremely slowly and may accumulate new masking mutations during selection/propagation, we studied the effect of MAPK signaling on DARPP-32 mRNA expression by treatment of PCCL3 thyroid cells with U0126 for 18 h to inhibit MEK (Fig. 4C). The control at the left shows that U0126 was effectively inhibiting ERK activity (shown as phospho-ERK in the *insert*) and increased DARPP-32 protein levels by 3-fold; the *right panel* shows that DARPP-32 mRNA levels were unaltered by the treatment, suggesting that the effects of MAPK signaling are primarily mediated via increasing DARPP-32 protein degradation.

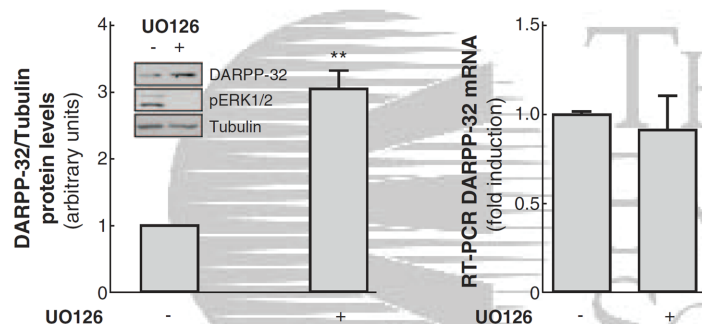
### A HIGH MEK ACTIVITY



### B LOW MEK ACTIVITY



### C MEK BLOCKADE



**FIG. 4.** MEK/ERK signaling down-regulates DARPP-32. **A**, Western blotting using the indicated antibodies of thyroid cells transformed with oncogenic *Ha-ras* reveal high basal levels of both p42 and p44 ERK1/2 and very low DARPP-32 expression, whereas *K-ras* expressing cells show high basal levels of p44 but not p42, and DARPP-32 is not detected. **B**, Thyroid cells stably expressing the inactive MEK mutant S>A showed very low levels of ERK1/2 and very high DARPP-32 levels (4- to 6-fold higher than in the control parental cells). Results from three independent clones are shown. **C**, MEK blockade by U0126 in PCCL3 cells cultured in 6H medium [Western blot (left panel) and RT-PCR (right panel)]. The Western blot shows increased DARPP-32 protein levels, whereas the RT-PCR shows unmodified mRNA levels. Data are shown as mean  $\pm$  SD from three independent experiments. \*\*,  $P < 0.01$ .

### DARPP-32 levels control the kinetics of MEK activation

MEK is inactivated by PP1 (14, 15), a key phosphatase that is inhibited by DARPP-32 when phosphorylated on Threo34 in response to cAMP signaling (20, 21). Because DARPP-32 is depleted by MEK/ERK activation, reduced DARPP-32 levels should lead to increased PP1 activity and consequently decreased MEK/MAPK signaling. This constitutes an autoregulatory loop by which MAPK signaling represses DARPP-32 protein levels and the duration of MEK activation is regulated through DARPP-32. Thus, DARPP-32 may determine whether MAPK signaling is transient or sustained.

MEK/ERK activity in thyroid cells is induced by TSH+IGF-I, and this combination also synergistically induces high DARPP-32 (Fig. 2). We therefore compared

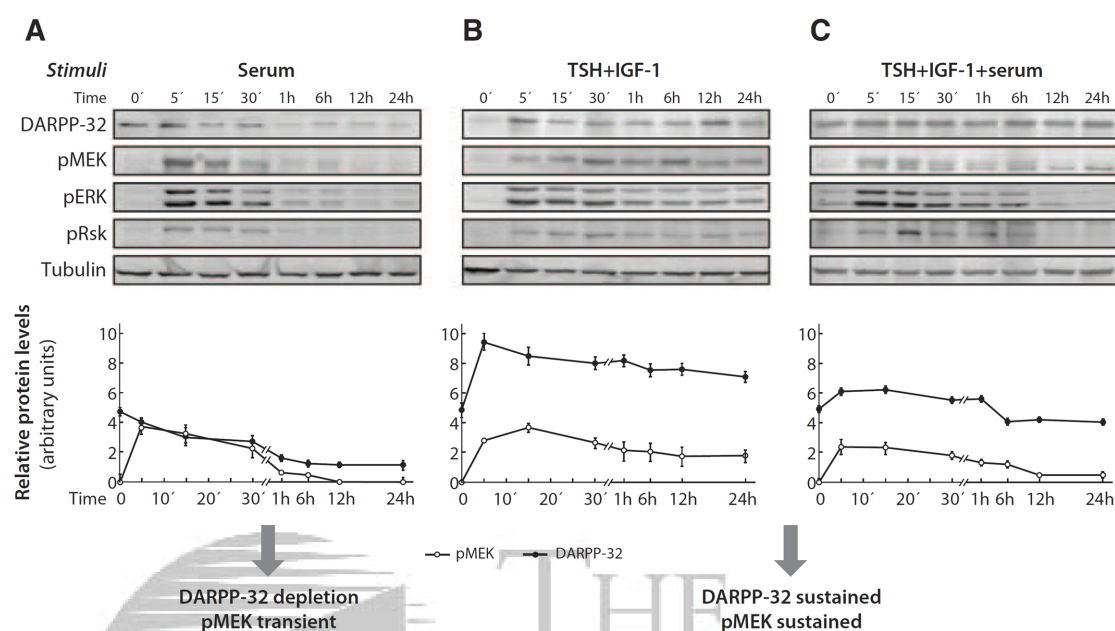
the kinetics of MEK/ERK activation by either TSH+IGF-I or serum. Figure 5A shows that serum promotes transient MEK/ERK/Rsk activation that correlates with DARPP-32 depletion. Figure 5B shows that, in contrast, TSH+IGF-I induce DARPP-32 accumulation that correlates with sustained MEK and ERK activation. Serum+TSH+IGF-I treatment (Fig. 5C) results in compensation of the serum-dependent DARPP-32 degradation with *de novo* synthesis and stabilization induced by TSH+IGF-I. The *de novo* synthesized DARPP-32 that compensates its degradation in the presence of serum again correlates with MEK/ERK activation being sustained to a degree intermediate between the transient activation after serum induction and the sustained activation promoted by TSH+IGF-I. These data are consistent with a model in which DARPP-32 accumulation and phosphorylation in response to TSH and IGF-I inhibits PP1 and allows sustained MEK activation. Conversely, when DARPP-32 is degraded, the failure to inhibit PP1 activity that subsequently limits MEK signaling provides transient MAPK activation.

### DARPP-32 is required to maintain responsiveness of the MEK/ERK pathway

Feedback mechanisms are generally used in physiology to control regulatory networks. We have shown that

MEK/ERK activation depletes DARPP-32 and that accumulation of DARPP-32 in response to TSH+IGF-I signaling correlates with sustained MEK/ERK activity. To investigate further the role of DARPP-32 in MAPK signaling, we disconnected TSH+IGF-I effects on MEK/ERK activation from their effects on DARPP-32 renewal using siRNA interference. Because DARPP-32 is a highly stable protein (Fig. 2C), in previous experiments we placed cells in 4H medium for 7 d to enable DARPP-32 levels to reach the basal levels necessary to observe a robust induction by TSH+IGF-I. However, starvation for 7 d leads to G0/G1 arrest and cells cannot be transfected with siRNA. To circumvent this problem, we transfected cells with control scrambled siRNA or siRNA specific for DARPP-32 in 6H medium for 24 h and then starved in 4H medium for 24 h

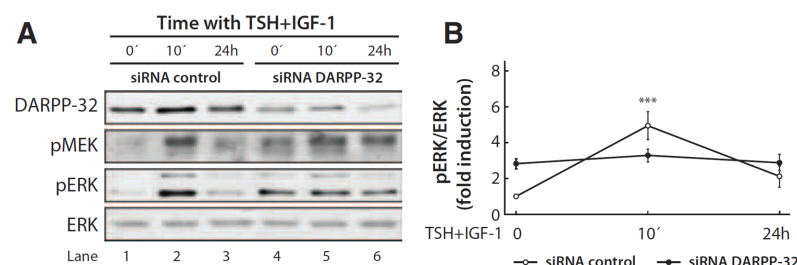




**FIG. 5.** DARPP-32 levels control the kinetics of MEK activation. Western blotting using indicated antibodies (*upper panels*) of PCCl3 thyroid cells cultured for 7 d in the absence of TSH, IGF-I, and serum were stimulated as indicated. Comparison of time courses after the addition of serum (A), TSH+IGF-I (TI) (B), or TI+serum (C). *Lower panels* show the duration of MEK activation after quantification of four independent experiments for each time course. Values of pMEK (○) and DARPP-32 (●) refer to their levels at time 0 in each treatment. An arbitrary value (5) has been given to the basal DARPP-32 in each treatment to better observe the changes and the time course. Values are expressed as mean  $\pm$  SD.

before inducing with TSH+IGF-I for another 24 h. Note that the effects of DARPP-32 siRNA decrease 3 d after transfection (not shown). In the siRNA depletion experiments, time 0 is therefore equivalent to 2 d after transfection with siRNA. Because cells have been starved in 4H medium for only 24 h, DARPP-32 levels have not been sufficiently reduced to see a robust induction by TSH+IGF-I. Under these conditions, TSH+IGF-I addition to control cells transfected with scrambled siRNA leads to a rapid activation of MEK and ERK phosphorylation. Under these circumstances MEK/ERK activation nicely paralleled DARPP-32 renewal by TSH+IGF-I (Fig. 6A, lanes 1–3). By contrast, when DARPP-32 siRNA prevents *de novo* synthesis of DARPP-32, basal MEK and ERK activity is enhanced compared with

control cells (Fig. 6A, compare lanes 1 and 4) and no increase in MEK or ERK activity is induced by TSH+IGF-I (Fig. 6A, lanes 4–6). One explanation for these observations is that the residual, undepleted stock of DARPP-32 protein effectively inhibits PP1 to elevate basal phospho-MEK levels that then acts as a barrier to prevent further stimulation of MAPK signaling. Together these data suggest, first, that MAPK-driven degradation of DARPP-32 is required to release PP1 to dephosphorylate MEK and that without this occurring, the activation of the MAPK pathway is impaired; and second, that *de novo* synthesis of DARPP-32 is necessary to restore inhibition of PP1 activity because unrestricted PP1 activity would prevent activation of MAPK signaling. Thus, DARPP-32 turnover, comprising continuous MAPK-dependent degradation combined with MAPK independent DARPP-32 renewal, will be necessary to maintain sensitivity of the MAPK pathway.



**FIG. 6.** Continuous synthesis of DARPP-32 is required for MEK/ERK responsiveness. A, Western blot using indicated antibodies of PCCL3 cells transfected with either a control scrambled siRNA (lanes 1–3) or a DARPP-32-specific siRNA (lanes 4–6) and treated as indicated with TSH and IGF-I for the indicated times. B, Statistical analysis of data from five independent experiments; values represent the mean  $\pm$  SD for the points shown in A.

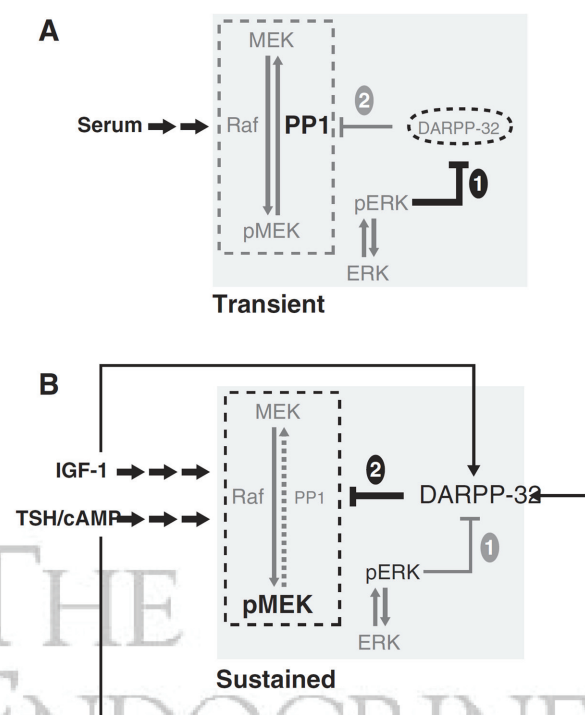
## Discussion

A major issue in thyroid biology is to understand how TSH and IGF-I control the kinetics of MAPK activation, a major determinant of thyroid differentiation and proliferation that is deregulated in thyroid cancer. Although

considerable attention has been focused on upstream activators of MAPK signaling such as Ras or BRAF (revised in Ref. 32), our results presented here indicate that DARPP-32 may represent a key regulator of events downstream of BRAF.

Serum is required for proliferation of thyroid cells in culture and its addition to quiescent thyroid cells induces transient MEK/ERK activation that mediates DARPP-32 protein degradation. MAPK signaling-driven protein degradation is a common mechanism that promotes protein turnover in response to mitogenic signals (33, 34). The degradation of DARPP-32 by serum-induced MAPK activation can be overcome by the MAPK-independent action of TSH that increases DARPP-32 mRNA expression and IGF-I that mediates a posttranscriptional increase in DARPP-32 levels. The transcriptional effects of TSH might be induced via  $G_{\alpha s}$  or  $G_{\alpha q}/G_{11}$  coupling to the thyrotropin receptor, which will be signaling to increase the levels of cAMP but also of inositol 1,4,5-triphosphate (28, 35) or may signal through cascades stimulated by the liberated  $G\beta/\gamma$  subunits and up-regulate PI3K (36). PI3K activation by IGF-I, however, does not induce transcriptional activation of DARPP-32; therefore, TSH-mediated transcriptional induction of DARPP-32 might be exerted through PI3K-independent pathways, and further research will elucidate the mechanisms involved. On the other hand, IGF-I induces a posttranscriptional increase in DARPP-32 protein levels that might be mediated via mammalian target of rapamycin-dependent increase in protein synthesis as described for survivin (37) or through increased stability of the protein as described for sirtuin 1 (38) or other proteins (39, 40), and further research is needed to clarify this point.

Together TSH and IGF-I provide a differentiation signal and trigger sustained MAPK activation. Although other possibilities may exist, our results are consistent with a model (Fig. 7) in which DARPP-32, which is required for differentiation, regulates the kinetic of activation and sensitivity of MAPK signaling via its capacity to inhibit PP1, a MEK phosphatase. In this model, serum induction of MEK/ERK (Fig. 7A) leads to the subsequent degradation of DARPP-32 and consequently failure to inhibit PP1 to ensure transient MEK activity. By contrast, TSH+IGF-I induction of MEK/ERK (Fig. 7B) is not followed by DARPP-32 depletion because TSH+IGF-I-mediated activation of MEK/ERK, and consequent DARPP-32 degradation is compensated by TSH-activating DARPP-32 transcriptionally and IGF-I up-regulating DARPP-32 expression posttranscriptionally. The maintenance of DARPP-32 expression in response to TSH+IGF-I therefore means that PP1 is inhibited and MAPK activation is sustained, an output compatible with differentiation.



**FIG. 7.** Model showing potential feedback between DARPP-32 and pERK. The gray square at the background, common in A and B, represents the model proposed to recapitulate the results from this work: phosphorylation of MEK leads to phospho-ERK accumulation and consequently DARPP-32 depletion ①. Given that DARPP-32 levels directly correlate with duration of phospho-MEK signaling, we incorporate PP1 in the model as a target known to be inhibited by DARPP-32 and also known to dephosphorylate phospho-MEK ②; PP1 is then proposed to link DARPP-32 levels to the duration of phospho-MEK signaling. A, Activation of MEK/ERK by serum promotes DARPP-32 degradation leading to PP1 release and subsequent dephosphorylation of MEK; the lack of compensatory mechanisms that maintain high DARPP-32 results in transient MEK signaling promoted by serum compatible with growth but not with differentiation. B, TSH+IGF-I activate both MEK/ERK and cAMP pathways with opposing effects on DARPP-32 levels. MEK/ERK activation leads to DARPP-32 degradation, but cAMP (independently of MEK) leads to increased DARPP-32 mRNA and protein levels and increased inhibition of PP-1. Therefore, high DARPP-32 levels are maintained by increased turnover, which is promoted by the balance between MEK/ERK and cAMP activities. We propose that high turnover of DARPP-32 is essential to sustained MEK activity because degradation of DARPP-32 molecules releases PP1 to dephosphorylate phospho-MEK, providing new MEK substrate for signaling; cAMP-induced newly synthesized phospho-Thr34-DARPP-32 molecules rebind and inhibit PP1 ensuring maintenance of newly phosphorylated MEK and sustained MAPK activation.

Importantly, the use of DARPP-32-specific siRNA to deplete DARPP-32 also revealed that the turnover of DARPP-32 is likely to represent a key component of its ability to regulate MAPK signaling. Specifically the results raise the possibility that long-lived DARPP-32 may act as a sink for PP1, leading to higher basal levels of phospho-MEK that then prevents further activation of the pathway. MAPK-triggered degradation of DARPP-32 would then be required to release PP1 to dephosphorylate



MEK providing substrate for activation of MAPK signaling. *De novo* synthesized DARPP-32 would be necessary to modulate the kinetics via inhibition of PP1 activity, thereby extending the duration of MEK phosphorylation. Consistent with *de novo* synthesis of DARPP-32 being necessary for MAPK signaling, Greengard and coworkers (19, 41) also reported a lack of MAPK induction by distinct stimuli in specific brain neurons of DARPP-32 knockout mice. The ability of DARPP-32 to affect the inducibility of MAPK signaling is particularly important because ERK activation follows Weber's law in sensory systems, which assigns a meaning to a signal according to the fold change in reference to its background levels (42, 43); therefore, the fold activation observed, rather than steady-state levels, will determine the output of MAPK signaling. Thus, the ongoing cycle of PP1 release and inhibition by DARPP-32 may allow growth compatible with differentiation. However, although we assign a key role to DARPP-32 in modulating the sensitivity and kinetics of MAPK signaling, other feedback and scaffolding mechanisms will also make a major contribution (44–48).

Ras-transformed thyroid cell lines with increased constitutive MEK/ERK activity and transformation potential exhibit dramatically low or absent DARPP-32 levels, respectively, most likely as a result of increased protein degradation combined with RAS-driven blockade of cAMP signaling (49). Perhaps TSH still signals via cAMP, but without DARPP-32, the TSH signal cannot modulate MAPK signaling giving a failure to differentiate.

In summary, our results suggest first, that DARPP-32 renewal is necessary to maintain sensitivity of the MEK/ERK pathway in thyroid cells; and second, that the balance between DARPP-32 levels and MEK/ERK activities will modulate the duration of the signal and are then critical for the cellular capacity to fine-tune a spectrum of responses according to the combination of stimuli and the general status of its signaling network. Although further work will be necessary to validate the model outlined above, the results reveal a key role for DARPP-32 in the complex interplay between TSH, IGF-I, and MAPK signaling in thyroid cells.

## Acknowledgments

We thank Dr. P. Greengard (Laboratory of Molecular and Cell Neuroscience, Rockefeller University, New York, NY) for kindly providing the anti-DARPP-32 antibodies and a rat DARPP-32 cDNA expression vector; Dr. L. D. Kohn (Edison Biotech Institute, Athens, OH) for the FRTL-5 cells; Dr. R. Di Lauro (Stazione Zoologica, A. Dohrn, Naples, Italy) for the Ras-transformed cell lines; Dr. Fusco (University degli Studi, Naples, Italy) for the PCCL3; and

Dr. Nancy Carrasco (Albert Einstein College of Medicine, New York, NY) for providing the anti-NIS antibody. We also thank Dr. C. Goding for MEK mutant retroviral vectors and for the critical reading of the manuscript.

Address all correspondence and requests for reprints to: Custodia García-Jiménez, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Rey Juan Carlos, Avda de Atenas s/n Alcorcón, 28922 Madrid, Spain. E-mail: custodia.garcia@urjc.es.

This work was supported by a grant from the Fundación Mutua Madrileña 2007-2010 (to C.G.-J.) and Grant BFU2010-16025 from Dirección General de Ciencia y Tecnología, and Grant RETICC RD06/0020/0060 from the FIS Instituto de Salud Carlos III (to P.S.).

Disclosure Summary: No potential conflicts of interest were disclosed.

## References

1. Mayawala K, Gelmi CA, Edwards JS 2004 MAPK cascade possesses decoupled controllability of signal amplification and duration. *Biophys J* 87:L01–L02
2. Marshall CJ 1995 Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80:179–185
3. Muller M, Obeyesekere M, Mills GB, Ram PT 2008 Network topology determines dynamics of the mammalian MAPK1,2 signaling network: bifan motif regulation of C-Raf and B-Raf isoforms by FGFR and MC1R. *FASEB J* 22:1393–1403
4. Frasca F, Nucera C, Pellegri G, Gangemi P, Attard M, Stella M, Loda M, Vella V, Giordano C, Trimarchi F, Mazzon E, Belfiore A, Vigneri R 2008 BRAF(V600E) mutation and the biology of papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 15:191–205
5. Xing M 2007 BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev* 28:742–762
6. Dumaz N, Marais R 2005 Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signaling pathways. Based on the anniversary prize of the Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie Lecture delivered on 5 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels. *FEBS J* 272:3491–3504
7. Vossler MR, Yao H, York RD, Pan MG, Rim CS, Stork PJ 1997 cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* 89:73–82
8. Altschuler D, Lapetina EG 1993 Mutational analysis of the cAMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation site of Rap1b. *J Biol Chem* 268:7527–7531
9. Peyssonnaud C, Eychène A 2001 The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell* 93:53–62
10. Smith FD, Langeberg LK, Cellurale C, Pawson T, Morrison DK, Davis RJ, Scott JD 2010 AKAP-Lbc enhances cyclic AMP control of the ERK1/2 cascade. *Nat Cell Biol* 12:1242–1249
11. Smith FD, Langeberg LK, Scott JD 2011 Plugging PKA into ERK scaffolds. *Cell Cycle* 10:731–732
12. Dent P, Jelinek T, Morrison DK, Weber MJ, Sturgill TW 1995 Reversal of Raf-1 activation by purified and membrane-associated protein phosphatases. *Science* 268:1902–1906
13. Gómez N, Cohen P 1991 Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases. *Nature* 353:170–173
14. Manfroid I, Martial JA, Muller M 2001 Inhibition of protein phosphatase PP1 in GH3B6, but not in GH3 cells, activates the MEK/

- ERK/c-fos pathway and the human prolactin promoter, involving the coactivator CPB/p300. *Mol Endocrinol* 15:625–637
15. Mitsuhashi S, Shima H, Tanuma N, Matsuura N, Takekawa M, Urano T, Kataoka T, Ubukata M, Kikuchi K 2003 Usage of tautomycin, a novel inhibitor of protein phosphatase 1 (PP1), reveals that PP1 is a positive regulator of Raf-1 *in vivo*. *J Biol Chem* 278:82–88
  16. Dupre KB 2008 A potential neuroanatomical dissociation of DARPP-32 in striatal ERK signaling. *J Neurosci* 28:10783–10785
  17. Gerfen CR, Paletzki R, Worley P 2008 Differences between dorsal and ventral striatum in Drd1a dopamine receptor coupling of dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein-32 to activation of extracellular signal-regulated kinase. *J Neurosci* 28:7113–7120
  18. Santini E, Valjent E, Usiello A, Carta M, Borgkvist A, Girault JA, Hervé D, Greengard P, Fissone G 2007 Critical involvement of cAMP/DARPP-32 and extracellular signal-regulated protein kinase signaling in L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurosci* 27:6995–7005
  19. Valjent E, Pascoli V, Svenningsson P, Paul S, Enslen H, Corvol JC, Stipanovich A, Caboche J, Lombroso PJ, Nairn AC, Greengard P, Hervé D, Girault JA 2005 Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:491–496
  20. Huang HB, Horiuchi A, Watanabe T, Shih SR, Tsay HJ, Li HC, Greengard P, Nairn AC 1999 Characterization of the inhibition of protein phosphatase-1 by DARPP-32 and inhibitor-2. *J Biol Chem* 274:7870–7878
  21. Watanabe T, Huang HB, Horiuchi A, da Cruze Silva EF, Hsieh-Wilson L, Allen PB, Shenolikar S, Greengard P, Nairn AC 2001 Protein phosphatase 1 regulation by inhibitors and targeting subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:3080–3085
  22. García-Jiménez C, Zaballos MA, Santisteban P 2005 DARPP-32 (dopamine and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-regulated neuronal phosphoprotein) is essential for the maintenance of thyroid differentiation. *Mol Endocrinol* 19:3060–3072
  23. Aza-Blanc P, Di Lauro R, Santisteban P 1993 Identification of a cis-regulatory element and a thyroid-specific nuclear factor mediating the hormonal regulation of rat thyroid peroxidase promoter activity. *Mol Endocrinol* 7:1297–1306
  24. Kimura T, Van Keymeulen A, Golstein J, Fusco A, Dumont JE, Roger PP 2001 Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of *in vitro* models. *Endocr Rev* 22:631–656
  25. Santisteban P, Kohn LD, Di Lauro R 1987 Thyroglobulin gene expression is regulated by insulin and insulin-like growth factor I, as well as thyrotropin, in FRTL-5 thyroid cells. *J Biol Chem* 262:4048–4052
  26. Zakarija M, McKenzie JM 1989 Variations in the culture medium for FRTL5 cells: effects on growth and iodide uptake. *Endocrinology* 125:1253–1259
  27. Riedel C, Levy O, Carrasco N 2001 Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin. *J Biol Chem* 276:21458–21463
  28. García-Jiménez C, Santisteban P 2007 TSH signalling and cancer. *Arq Bras Endocrinol Metab* 51:654–671
  29. Lenormand P, Brondello JM, Brunet A, Pouyssegur J 1998 Growth factor-induced p42/p44 MAPK nuclear translocation and retention requires both MAPK activation and neosynthesis of nuclear anchoring proteins. *J Cell Biol* 142:625–633
  30. Nakao T, Kim S, Ohta K, Kawano H, Hino M, Miura K, Tatsumi N, Iwao H 2002 Role of mitogen-activated protein kinase family in serum-induced leukaemia inhibitory factor and interleukin-6 secretion by bone marrow stromal cells. *Br J Pharmacol* 136:975–984
  31. Zhu J, Blenis J, Yuan J 2008 Activation of PI3K/Akt and MAPK pathways regulates Myc-mediated transcription by phosphorylating and promoting the degradation of Mad1. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:6584–6589
  32. Nucera C, Lawler J, Parangi S 2011 BRAF(V600E) and microenvironment in thyroid cancer: a functional link to drive cancer progression. *Cancer Res* 71:2417–2422
  33. Krueger F, Madeja Z, Hemberger M, McMahon M, Cook SJ, Gaunt SJ 2009 Down-regulation of Cdx2 in colorectal carcinoma cells by the Raf-MEK-ERK 1/2 pathway. *Cell Signal* 21:1846–1856
  34. Vial E, Marshall CJ 2003 Elevated ERK-MAP kinase activity protects the FOS family member FRA-1 against proteasomal degradation in colon carcinoma cells. *J Cell Sci* 116:4957–4963
  35. Kero J, Ahmed K, Wettschureck N, Tunaru S, Wintermantel T, Greiner E, Schütz G, Offermanns S 2007 Thyrocyte-specific Gq/G11 deficiency impairs thyroid function and prevents goiter development. *J Clin Invest* 117:2399–2407
  36. Zaballos MA, Garcia B, Santisteban P 2008 Gβγ dimers released in response to thyrotropin activate phosphoinositide 3-kinase and regulate gene expression in thyroid cells. *Mol Endocrinol* 22:1183–1199
  37. Vaira V, Lee CW, Goel HL, Bosari S, Languino LR, Altieri DC 2007 Regulation of survivin expression by IGF-1/mTOR signaling. *Oncogene* 26:2678–2684
  38. Byles V, Chmielewski LK, Wang J, Zhu L, Forman LW, Faller DV, Dai Y 2010 Aberrant cytoplasm localization and protein stability of SIRT1 is regulated by PI3K/IGF-1R signaling in human cancer cells. *Int J Biol Sci* 6:599–612
  39. Fang CH, Li BG, Wang JJ, Fischer JE, Hasselgren PO 1997 Insulin-like growth factor 1 stimulates protein synthesis and inhibits protein breakdown in muscle from burned rats. *J Parenter Enteral Nutr* 21:245–251
  40. Li BG, Hasselgren PO, Fang CH 2005 Insulin-like growth factor-I inhibits dexamethasone-induced proteolysis in cultured L6 myotubes through PI3K/Akt/GSK-3β and PI3K/Akt/mTOR-dependent mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol* 37:2207–2216
  41. Yan Z, Feng J, Fienberg AA, Greengard P 1999 D(2) dopamine receptors induce mitogen-activated protein kinase and cAMP response element-binding protein phosphorylation in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:11607–11612
  42. Cohen-Saidon C, Cohen AA, Sigal A, Liron Y, Alon U 2009 Dynamics and variability of ERK2 response to EGF in individual living cells. *Mol Cell* 36:885–893
  43. Goentoro L, Shoval O, Kirschner MW, Alon U 2009 The incoherent feedforward loop can provide fold-change detection in gene regulation. *Mol Cell* 36:894–899
  44. Bae D, Ceryak S 2009 Raf-independent, PP2A-dependent MEK activation in response to ERK silencing. *Biochem Biophys Res Commun* 385:523–527
  45. Jurek A, Amagasaki K, Gembarska A, Heldin CH, Lennartsson J 2009 Negative and positive regulation of MAPK phosphatase 3 controls platelet-derived growth factor-induced Erk activation. *J Biol Chem* 284:4626–4634
  46. Pullikuth A, McKinnon E, Schaeffer HJ, Catling AD 2005 The MEK1 scaffolding protein MP1 regulates cell spreading by integrating PAK1 and Rho signals. *Mol Cell Biol* 25:5119–5133
  47. Sharma C, Vomastek T, Tarcsafalvi A, Catling AD, Schaeffer HJ, Eblen ST, Weber MJ 2005 MEK partner 1 (MP1): regulation of oligomerization in MAP kinase signaling. *J Cell Biochem* 94:708–719
  48. Vomastek T, Schaeffer HJ, Tarcsafalvi A, Smolkin ME, Bissonette EA, Weber MJ 2004 Modular construction of a signaling scaffold: MORF1 interacts with components of the ERK cascade and links ERK signaling to specific agonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6981–6986
  49. Baratta MG, Porreca I, Di Lauro R 2009 Oncogenic ras blocks the cAMP pathway and dedifferentiates thyroid cells via an impairment of pax8 transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 23:838–848
  50. Francis-Lang H, Zannini M, De Felice M, Berlingieri MT, Fusco A, Di Lauro R 1992 Multiple mechanisms of interference between transformation and differentiation in thyroid cells. *Mol Cell Biol* 12:5793–5800
  51. Cowley S, Paterson H, Kemp P, Marshall CJ 1994 Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 77:841–852
  52. Chomczynski P, Sacchi N 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159





ate and multivariate analysis was performed to determine independent predictors of mortality and the performance of DM, CP and MELD scores for predicting mortality was evaluated by AUROC curves.

**Results:** 110 patients were included: 60 without DM and 50 with DM. Diabetic patients had significantly higher frequency of cryptogenic cirrhosis, anemia, hypoalbuminemia, and hypercreatininemia. They also had significantly higher BMI and Child-Pugh score. The 2.5-years cumulative survival was significantly lower in patients with DM (48% vs. 69%,  $P < 0.05$ ). Only serum creatinine  $> 1.5$  mg/dL and Child-Pugh score class C were independent predictors of death. AUROC values of DM, CP and MELD were 0.62, 0.69 and 0.63, respectively ( $P > 0.05$ ).

**Conclusion:** DM was associated with a significant increase in mortality. Serum creatinine  $> 1.5$  mg/dL and Child-Pugh score class C were independent predictors of death. Finally, DM was a predictor of death with similar efficacy to that of CP and MELD scores.

#### GLUCOSE INDUCES GASTRIC INHIBITORY PEPTIDE (GIP) GENE EXPRESSION AND NOT ONLY ITS SECRETION

A. Chocarro-Calvo, J.M. Garcia-Martinez, C. García-Jiménez

*Biochemistry, Physiology and Genetics, Universidad Rey Juan Carlos, Alcorcon, Spain*

**Introduction:** Incretins are responsible for 70% of insulin secretion in response to an oral glucose load. Gastric inhibitory peptide (GIP) constitutes more than 75% of plasma incretin levels in humans. Interference of GIP signalling prevents diet-induced obesity in mice and surgical removal of GIP producing K cells immediately ameliorates glycaemia in type 2 diabetic (T2D) patients, suggesting that GIP may play a role in the origin of T2D.

Glucose and fat are the main physiological stimulus for GIP secretion.

**Objectives:** To study the influence of glucose in Wnt-induced GIP gene expression in entero endocrine cells.

**Methods:** Mouse entero endocrine STC-1 cells were used to study the influence of glucose on GIP expression. Endogenous gene expression was analysed by RT/PCR and chromatin immunoprecipitation. Mechanistic studies were done using mGip promoter constructs fused to the luciferase reporter coding sequence. Fractionated extracts, immunofluorescence and Immunocytochemistry was used to assess translocation of essential Wnt components.

**Results:** Glucose is required to maintain basal GIP gene expression. Glucose induction of GIP expression is enhanced by the presence of Wnt or lithium. Glucose effects on mGip gene expression are exerted at least partially through the effectors of the Wnt signalling pathway.

**Conclusion:** Glucose modulates Wnt signalling in entero endocrine cells and promotes nuclear accumulation of essential Wnt effectors to induce incretin production.

#### HYPERINSULINEMIA MAY ENHANCE GASTRIC INHIBITORY PEPTIDE (GIP) PRODUCTION IN HYPERGLYCAEMIC CONDITIONS

J.M. Garcia-Martinez, A. Chocarro-Calvo, C. García-Jiménez

*Biochemistry, Physiology and Genetics, Universidad Rey Juan Carlos, Alcorcon, Spain*

**Introduction:** Normal insulin secretion by  $\beta$ cells depends on glucose and incretins in plasma. Incretins -of which Gastric inhibitory peptide (GIP) constitutes more than 75% of human plasma levels- are responsible for up to 70% of insulin secretion in response to glucose ingestion. The incretin effect is lost in type 2 diabetic(T2D) patients and GIP signalling interference/ablation ameliorates glycaemic control in T2D patients, suggesting that GIP may play a role in the origin of T2D.

**Objectives:** To study the influence of insulin on GIP gene expression in entero endocrine cells.

**Methods:** Mouse entero endocrine STC-1 cells were used to study the influence of glucose and insulin on GIP expression. Endogenous gene expression was analysed by RT/PCR and chromatin immunoprecipitation. Mechanistic studies were done using mGip promoter constructs fused to the luciferase reporter coding sequence as well as expression vectors for critical intermediaries and specific inhibitors.

**Results:** Insulin induces expression of GIP in entero endocrine cells in hyperglycaemic conditions, but not in eu- or hypo-glycaemia. The effects of Insulin and glucose are partially mediated through Wnt effectors.

**Conclusion:** We propose a feed back loop for regulation of Insulin and GIP production where glucose is the critical limiting factor. Glucose promotes GIP production and then synergises with GIP to promote Insulin secretion; if glucose levels remain high glucose synergises with Insulin to promote more GIP production. Insulin mediated lowering of glucose plasma levels and in low glucose insulin will not induce GIP production. Low glucose, low GIP stops insulin secretion.

#### THE NOVEL DPP-4 INHIBITOR LINAGLIPTIN CAN BE ADMINISTERED TO PATIENTS WITH VARIOUS DEGREES OF HEPATIC IMPAIRMENT WITHOUT DOSE ADJUSTMENT

U. Graefe-Mody<sup>1</sup>, P. Rose<sup>1</sup>, A. Ring<sup>1</sup>, L. Waldhauser<sup>1</sup>, R. Cinca<sup>2</sup>, H.-J. Woerle<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Biberach, Germany, <sup>2</sup>IFE Human Pharmacology SRL, Timisoara, Romania

**Objective:** To investigate the effect of hepatic impairment (HI) on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of linagliptin, an orally active, highly-potent DPP-4 inhibitor with predominantly non-renal elimination.

**Methods:** Healthy subjects ( $n=8$ ) and patients with mild ( $n=8$ ), moderate ( $n=9$ ) and severe ( $n=8$ ) HI were evaluated. Primary endpoints were linagliptin exposure at steady-state ( $AUC_{\tau,ss}$  and  $C_{max,ss}$ ) following 5 mg linagliptin once daily for 7 days in patients with mild and moderate HI versus healthy subjects, and linagliptin exposure after a single 5 mg dose ( $AUC_{0-24}$  and  $C_{max}$ ) for severe HI versus healthy subjects.

**Results:** In mild HI, linagliptin  $AUC_{\tau,ss}$  was 25% lower (geometric mean ratio [GMR]: 75.5; 90% confidence interval [CI]: 61.6, 92.5) and  $C_{max,ss}$  was 36% lower (GMR: 64.4; 90% CI: 43.2, 96.0) versus healthy subjects. Exposure was reduced to a lesser extent in moderate HI ( $AUC_{\tau,ss}$  GMR: 85.5; 90% CI: 70.2, 104.2 and  $C_{max,ss}$  GMR: 92.3; 90% CI: 62.8, 135.6). After a single dose,  $AUC_{0-24}$  in patients with severe HI was similar to healthy subjects (GMR: 100.4; 90% CI: 75.0, 134.3);  $C_{max}$  was 23% lower (GMR: 77.0; 90% CI: 44.9, 132.3). Accumulation based on  $AUC$  or  $C_{max}$ , and renal excretion of unchanged linagliptin ( $\leq 7\%$ ) were comparable across groups. Median inhibition of plasma DPP-4 was similar in the healthy, mild and moderate groups at steady-state trough levels (91%, 90% and 89%) and in the severe group at 24 h after a single dose (84%). Linagliptin was well tolerated.

**Conclusion:** No dose adjustment is required when administering linagliptin to patients with HI.

#### PSMD9 LINKAGE STUDIES IN T2D-ASSOCIATED PHENOTYPES

C. Gragnoli

*Endocrinology, Penn State Hershey Med Center, Hershey, PA, USA*

It was previously reported that the PSMD9 gene is in linkage with type 2 diabetes (T2D) and MODY3 in Italian families. We have also shown how rare unique variants and/or mutation in PSMD9 may contribute to T2D. We hereby report the findings of the PSMD9 haplo-



## 50. CONCENTRACIONES SÉRICAS DE ADIPONECTINA Y MORTALIDAD EN PACIENTES EN DIÁLISIS

J.J. Díez<sup>a</sup>, P. Estrada<sup>b</sup>, M.A. Bajo<sup>b</sup>, M.J. Fernández-Reyes<sup>c</sup>, C. Grande<sup>b</sup>, G. del Peso<sup>b</sup>, M. Heras<sup>c</sup>, A. Molina<sup>c</sup>, P. Iglesias<sup>a</sup>, R. Sánchez-Villanueva<sup>b</sup> y R. Selgas<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Hospital Ramón y Cajal. Madrid. España. <sup>b</sup>Hospital La Paz. Madrid. España. <sup>c</sup>Hospital General. Segovia. España.

**Introducción:** La elevación de las concentraciones séricas de adiponectina se ha asociado a un perfil de riesgo cardiovascular favorable y a un teórico efecto beneficioso sobre la supervivencia.

**Objetivos:** Evaluar de forma prospectiva el valor de la cuantificación de adiponectina en dos ocasiones separadas un año para la predicción de la mortalidad en pacientes en diálisis.

**Métodos:** Hemos estudiado 184 pacientes urémicos en tratamiento dialítico (diálisis peritoneal, 86; hemodiálisis, 98; 83 mujeres, 101 varones) con edades comprendidas entre 19 y 86 años. Se cuantificaron las concentraciones séricas de adiponectina al comienzo del estudio y al cabo de 12 meses. Se estudió la mortalidad por todas las causas en relación con los valores de adiponectina. El tiempo medio de observación fue  $34 \pm 16$  meses y el total de 6.235 pacientes-mes.

**Resultados:** Sesenta y siete pacientes (36,4%) murieron. El análisis de Kaplan-Meier mostró que los pacientes con adiponectina sérica en el tercil más alto presentaban un tiempo de supervivencia (media  $\pm$  SE,  $60,6 \pm 4,4$  meses) superior al hallado en los sujetos situados en el tercil medio ( $44,7 \pm 2,9$  meses) y bajo ( $43,0 \pm 2,7$  meses). El análisis de Cox multivariante mostró que el riesgo relativo (HR) de muerte para cambios en una desviación estándar de adiponectina fue de 0,70 (0,50-0,98) para la adiponectina basal, y de 0,68 (0,49-0,95) para la media de adiponectina basal y a 1 año.

**Conclusiones:** Los pacientes en diálisis con concentraciones medias de adiponectina sérica elevadas presentan una menor mortalidad. Ello sugiere que la presencia de niveles elevados y estables de adiponectina supone un mejor pronóstico vital en pacientes en diálisis.

## 51. LA GLUCOSA ES NECESARIA PARA LA INDUCCIÓN DEL PÉPTIDO INSULINOTRÓPICO DEPENDIENTE DE GLUCOSA (GIP) POR WNT

A. Chocarro Calvo, J.M. García Martínez y C. García Jiménez

Universidad Rey Juan Carlos. Alcorcón. Madrid. España.

**Introducción:** Las incretinas son hormonas intestinales que potencian la secreción pancreática de insulina. Hasta el 70% de la insulina secretada tras la ingesta se debe al efecto de las incretinas. La incretina mayoritaria del cuerpo humano es GIP, cuyos niveles suponen el 75% de los niveles totales de incretina en plasma. El control de la producción de GIP no se conoce. Nuestro grupo ha demostrado recientemente que la señalización por WNT aumenta la producción de GIP en células entero endocrinas. También demostramos que las proteínas WNT3a y el litio usan los mismos intermediarios y efectores para inducir la expresión de GIP. El objetivo de este trabajo ha sido investigar los efectos de la glucosa sobre la producción de GIP basal e inducida por WNT/litio.

**Métodos:** La actividad del promotor de GIP de ratón se estudia mediante cotransfecciones en células entero endocrinas tratadas con glucosa y/o litio. La inducción de GIP se estudia por RT/PCR e inmunoprecipitación de cromatina. Los niveles de inducción y localización de proteínas por western blot e inmunocitoquímica.

**Resultados:** La glucosa es necesaria para mantener la expresión basal de GIP, en células entero endocrinas, y potencia la inducción por WNT/litio. La glucosa modifica la actividad del promotor de GIP. El mecanismo implica la translocación nuclear de  $\beta$ catenina y cambios en los niveles de factores de transcripción.

**Conclusiones:** Nuestros resultados indican que es necesaria la co-señalización de glucosa y WNT para una inducción eficiente de la producción de GIP. De manera similar, la co-señalización por glucosa y GIP es necesaria para una secreción eficiente de insulina. Nuestros resultados pueden tener importantes implicaciones en enfermedades metabólicas como diabetes y cáncer.

## 52. LA INSULINA INDUCE LA EXPRESIÓN DEL PÉPTIDO INSULINOTRÓPICO DEPENDIENTE DE GLUCOSA (GIP) EN CÉLULAS ENTEROENDOCRINAS A TRAVÉS DE LOS EFECTORES DE LA VÍA WNT/TCF

J.M. García Martínez, A. Chocarro Calvo y C. García Jiménez

Universidad Rey Juan Carlos. Alcorcón. Madrid. España.

**Introducción:** El 70% de la secreción pancreática de insulina en respuesta a glucosa se debe a la acción de las incretinas gastrointestinales (efecto incretina). La incretina mayoritaria del cuerpo humano es GIP (péptido insulínico dependiente de glucosa). El efecto incretina se pierde en los pacientes con diabetes y familiares de primer grado. Las dianas de GIP se extienden más allá del páncreas. GIP potencia la acumulación de triglicéridos por los adipocitos y la interferencia con su señal resulta en resistencia a la obesidad, un factor de riesgo para la diabetes. Nuestro grupo ha demostrado que las proteínas WNT y el Litio inducen la producción de GIP en células enteroendocrinas.

**Objetivos:** Determinar la influencia de la insulina sobre la producción de GIP.

**Métodos:** Se estudian (1) los cambios en la actividad del promotor de GIP con co-transfecciones de células STC-1 (único modelo in vitro capaz de secretar GIP) tratadas con insulina y/o litio (2) el mecanismo molecular de inducción por RT/PCR, inmunoprecipitación de cromatina y WB.

**Resultados:** Hemos identificado las secuencias y factores que median la inducción de GIP por la insulina en células enteroendocrinas así como las interacciones con efectores de la vía Wnt.

**Conclusiones:** La insulina induce la producción enteroendocrina de GIP y sus efectos pueden estar mediados a través de la entrada de glucosa y los efectores de la vía Wnt. Por tanto, proponemos el establecimiento de un bucle de retroalimentación positiva donde la glucosa sinergiza con GIP para estimular la secreción de insulina y con insulina para inducir la secreción de GIP. La disminución de los niveles de la glucosa (factor común), bloquea las inducciones por Insulina y GIP. Nuestros resultados pueden tener importantes implicaciones en enfermedades metabólicas como diabetes y cáncer.

## 53. EXPRESIÓN Y RELEVANCIA FUNCIONAL DEL SISTEMA KISS1/KISS1R EN PÁNCREAS Y SU REGULACIÓN POR DIFERENTES ESTADOS METABÓLICOS

A.J. Martínez Fuentes<sup>a</sup>, J. Córdoba Ortíz<sup>a</sup>, A. Pozo Salas<sup>a</sup>, B. Chanclón García<sup>a</sup>, M.D. Gahete Ortíz<sup>a</sup>, P. Benito López<sup>b</sup>, R. Kineman<sup>c</sup> y J.P. Castaño Fuentes<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Universidad de Córdoba y CIBERobn. Córdoba. España. <sup>b</sup>Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba. España. <sup>c</sup>Sección de Endocrinología, Diabetes y Metabolismo. Universidad de Illinois. Chicago. EEUU.

**Introducción:** El sistema de las kisspeptinas, productos del gen Kiss1, y su receptor Kiss1R fue descubierto originalmente por su acción antimetastática y posteriormente, se ha descrito extensamente como un sistema integrador de señales gonadales, estacionales y metabólicas en la regulación de la liberación de GnRH, y la consiguiente liberación de gonadotropinas y control de la función





## 51 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición

tida + metformina. El tejido adiposo subcutáneo central se redujo en un 5-9% con liraglutida + metformina, que fue significativamente diferente de glimepirida + metformina (que aumentó un 3%), pero no de placebo + metformina (con una reducción del 4%).

Se observó un aumento de la relación de atenuación hígado/bazo (indicando reducción de esteatosis hepática), con liraglutida 1,8 mg + metformina, que fue estadísticamente diferente de glimepirida + metformina.

La reducción del porcentaje de tejido adiposo total con liraglutida 1,2 mg + metformina y con liraglutida 1,8 mg + metformina fue estadísticamente diferente del aumento que se observó con glimepirida + metformina, aunque no lo fue en comparación con placebo + metformina (tabla).

## LEAD 2

(n = 160)	Liraglutida 0,6 mg + metformina	Liraglutida 1,2 mg + metformina	Liraglutida 1,8 mg + metformina	Placebo + metformina	Glimepirida + metformina
Cambio en $\Delta$ HbA <sub>1c</sub> ‡	0,69 ± 0,07	0,97 ± 0,07	-1,0 ± 0,07	+0,09 ± 0,09	-0,98 ± 0,07
Masa de tejido adiposo, kg	-0,74 ± 0,81*	1,64 ± 0,84*	-2,40 ± 0,69*	-1,13 ± 0,94	+1,13 ± 0,84
$\Delta$ Masa de tejido adiposo, kg	-0,26 ± 0,56*	-0,84 ± 0,58*	-1,54 ± 0,47*	-1,33 ± 0,65	+1,28 ± 0,58
$\Delta$ Tejido adiposo%	-0,5 ± 0,7	-1,1 ± 0,8*	-1,2 ± 0,6*	-0,2 ± 0,8	+0,4 ± 0,8

## LEAD 3

(n = 45)	Liraglutida 1,2 mg	Liraglutida 1,8 mg	Glimepirida
Cambio en HbA <sub>1c</sub> ‡	-0,85 ± 0,08	-1,14 ± 0,08	-0,51 ± 0,08
$\Delta$ Masa de tejido adiposo, kg	-1,97 ± 0,77*	-0,95 ± 0,75†	+2,41 ± 0,89
$\Delta$ Masa de tejido magro, kg	-1,11 ± 0,53	-1,51 ± 0,54	-0,55 ± 0,65
$\Delta$ Tejido adiposo %	-0,88 ± 0,53‡	-0,27 ± 51†	+2,6 ± 0,61

Cambios desde la basal: media ± SEM

†p < 0,05 vs glimepirida; \*p < 0,05 vs glimepirida + metformina.

‡Todos los sujetos randomizados.

Con el tratamiento con liraglutida a 1,2 mg y 1,8 mg en monoterapia, la reducción de la masa y del porcentaje de tejido adiposo fue estadísticamente diferente del aumento que se observó con glimepirida.

**Conclusiones:** Liraglutida, tanto en monoterapia como añadida a metformina, reduce de manera significativa el peso además del tejido adiposo total y visceral, comparado con glimepirida en sujetos con DT2.

## 3

### LA EXPRESIÓN DEL PÉPTIDO INSULINOTRÓPICO DEPENDIENTE DE GLUCOSA (GIP) SE INDUCE SINÉRGICAMENTE POR INSULINA Y GLUCOSA EN CÉLULAS ENTERO ENDOCRINAS

A. Chocarro-Calvo, J.M. García-Martínez y C. García-Jiménez  
Universidad Rey Juan Carlos. Alcorcón. Madrid.

**Introducción:** Las incretinas son hormonas gastrointestinales responsables de hasta un 80% de la secreción pancreática de in-

sulina en respuesta a glucosa. El péptido 1 análogo de glucagón (GLP-1) y el polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) son las 2 principales incretinas. GIP es una hormona pro-obesidad, condición previa al desarrollo de diabetes tipo 2 (T2D). Los pacientes T2D y sus familiares de primer grado presentan niveles elevados de GIP, sugiriendo que el control de los niveles de GIP es clave en la génesis de la T2D. Los pacientes T2D conservan intacta la respuesta pancreática a GLP-1 pero han perdido la sensibilidad a GIP. Los esfuerzos terapéuticos se han centrado en análogos de GLP-1. GIP podría ser clave para el desarrollo de estrategias preventivas.

**Objetivos:** Estudiar el control de la producción de GIP en células entero endocrinas por glucosa e insulina.

**Material y métodos:** La actividad del promotor de GIP de ratón se estudia mediante cotransfecciones en células entero endocrinas de ratón tratadas con glucosa, insulina y/o litio. La inducción de GIP endógeno se estudia por RT/PCR e inmunoprecipitación de cromatina.

**Resultados:** El fragmento [-920/+1] del promotor de GIP de ratón contiene las secuencias necesarias para la inducción transcripcional del gen por glucosa e insulina en células entero endocrinas. En condiciones hiper- o hipo-glucémicas se produce una estimulación o inhibición de la expresión de GIP respectivamente, indicando que las células poseen sensores de los niveles de glucosa. La insulina (100nM) induce GIP per se y adelanta y sinergiza con la glucosa.

El efecto de la insulina es similar al descrito previamente en nuestro laboratorio con litio. Usando las construcciones quiméricas TOP/FOFFlash, demostramos que el litio y la insulina usan los mismos efectores finales: factores TCF/LEF- $\beta$ catenina y a través de ellos gobiernan la expresión del gen de GIP en células entero endocrinas.

**Conclusiones:** Nuestros resultados sugieren que la inducción de la producción entero endocrina de GIP por glucosa se potencia en presencia de insulina. Proponemos el establecimiento de un bucle de retroalimentación positiva en el que la glucosa sinergiza con GIP para estimular la secreción pancreática de insulina y con insulina para estimular la secreción entero endocrina de GIP. En el momento en que disminuyan los niveles del factor común de estos 2 mecanismos, la glucosa, dejarán de producirse insulina y GIP parando el bucle.

## 4

### MAYOR TASA DE AMPUTACIONES DE MIEMBROS INFERIORES EN POBLACIÓN CON DIABETES MELLITUS EN EL ÁREA 3 DE MADRID (2001-2006)

J.A. Rubio García<sup>1</sup>, J. Álvarez Hernández<sup>1</sup>,  
S. Jiménez González<sup>1,2</sup>, C. Salido Campos<sup>3</sup>,  
A. Albarracín Serra<sup>5</sup>, G. Guadalix Hidalgo<sup>4</sup>,  
N. Gil-Fournier Esquerra<sup>1</sup> y M. Botella Serrano<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Endocrinología y Nutrición. <sup>2</sup>Fundación de Investigación. <sup>3</sup>Documentación Clínica. <sup>4</sup>Cirugía General. Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares. <sup>5</sup>Dirección General de Sistemas de Información Sanitaria. Servicio Madrileño de Salud.

**Introducción:** La población con diabetes mellitus (DM) tiene un riesgo de sufrir amputación de miembro inferior (AMI) que es de 10-30 veces superior a la población sin DM, sin embargo la incidencia de AMI es muy distinta entre poblaciones. Estas diferencias no se explican suficientemente bien por diferencias étnicas o metodológicas, habiéndose implicado diferencias en la prevalencia de la enfermedad vascular periférica u otros factores como la disponibilidad de los cuidados sanitarios. En España, en el área 7 de Madrid se han comunicado, durante 1989-93 y posteriormente 1997-99, una de las tasas de AMI más





puestas de gonadotropinas disminuidas tras la gonadectomía (GNX) que se asociaron a niveles atenuados de mRNA de KiSS-1 en hipotálamo. No obstante, la administración de kisspeptina en machos diabéticos indujo respuestas supra-máximas de LH y T, y normalizó los niveles de LH tras GNX. A su vez, las ratas hembra diabéticas a largo plazo presentaron anestro constante, niveles basales reducidos de LH y FSH, y respuestas disminuidas de gonadotropinas tras GNX; cambios que se asociaron a niveles hipotalámicos significativamente menores de mRNA de KiSS-1. Más aun, a pesar de la disminución de los niveles basales de gonadotropinas, las respuestas hormonales agudas tras la administración de kisspeptina fueron normales, y la inyección repetida de kisspeptina indujo un incremento de las respuestas gonadotrópicas en ratas hembra diabéticas.

**Conclusiones:** Nuestros resultados permiten caracterizar el curso temporal y la relevancia funcional de las alteraciones del sistema KiSS-1 en la generación del estado de hipo-gonadotropismo asociado a diabetes no controlada, contribuyendo a determinar la posible utilidad de las kisspeptinas en la intervención terapéutica de las alteraciones del eje reproductor femenino en la diabetes tipo 1.

### 34

#### REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GLP-1 EN CÉLULAS ENTEROENDOCRINAS POR SUERO Y GLUCOSA

A. Chocarro-Calvo, J.M. García-Martínez y C. García-Jiménez  
*Universidad Rey Juan Carlos, Alcorcón, Madrid.*

**Objetivos:** Estudiar la regulación transcripcional en células enteroendocrinas del gen del proglucagon (gcg) cuyo producto GLP-1 se secreta en respuesta a metabolitos.

**Metodología:** Modelo experimental: línea celular STC-1, derivada de tumor intestinal entero-endocrino de ratón, capaz de secretar GLP-1. La presencia de factores de transcripción y la inducción de genes específicos ha sido determinada mediante array y RT/PCR cuantitativa. La actividad de los promotores mediante transfecciones usando un polímero catiónico. Los niveles de inducción de proteínas por western blot y la especificidad y afinidad de los factores TCF/LEF por ensayos EMSA.

**Resultados:** Hemos clonado 1921bp del promotor del gen del proglucagon y delecciones sucesivas unidas al gen reportero luciferasa, mediante las que hemos determinado que el fragmento [-1163/+1] del promotor contiene las secuencias necesarias para la inducción transcripcional inmediata del gen por glucosa. La actividad de este promotor aumenta hasta 8 veces tras 30min de estimulación por glucosa. Este fragmento contiene sitios de unión para factores de transcripción SREBP-1 y XBP-1 y USF que se encuentran sobre-expresados en nuestras células y son dianas transcripcionales de varios metabolitos. La cotransfección con USF-2 aumenta la actividad del promotor gcg 4 veces. Además, la sobre-expresión de la subunidad catalítica de PKA induce 12 veces la actividad transcripcional en concordancia con estudios previos en rata. Curiosamente, nuestro promotor contiene múltiples sitios de regulación por factores LEF, diana transcripcional de la vía Wnt en respuesta a suero. Estos sitios son funcionales en experimentos EMSA. Los factores TCF1, TCF4 y LEF se expresan abundantemente en células STC-1. La estimulación con suero en ausencia de glucosa aumenta 2-3 veces los niveles de los represores transcripcionales LEF y Tbx3 dianas de la vía Wnt y reprime la expresión de gcg. La sobre-expresión de  $\beta$ -catenina convierte los factores TCF/LEF en activadores transcripcionales y en nuestras células induce 10 veces la actividad del promotor de gcg. La sobre-expresión de los represores Tbx3 y AP-4 reduce al 50% la actividad del promotor, y sus dominantes negativos inducen aumentos de hasta 4 veces.

**Conclusiones:** La expresión de GLP en células enteroendocrinas está regulada por suero y metabolitos a través de factores de transcripción que incluyen, además de dianas clásicas de PKA, otros factores como LEF1, Tbx3, AP-4 y USF.

### 35

#### ASOCIACIÓN ENTRE EL PERÍMETRO DE CINTURA Y LA PRESENCIA DE ALTERACIONES DE LA GLUCOSA (ESTUDIO PRED-IR)

R. Gomis<sup>1</sup>, C. Brotons<sup>2</sup>, M. de la Figuera<sup>3</sup>, R. Rodríguez<sup>4</sup> y J. Franch<sup>5</sup> en nombre del grupo investigador del estudio PRED-IR

<sup>1</sup>Hospital Clínic, Barcelona; <sup>2</sup>CAP Sardenya, Barcelona; <sup>3</sup>CAP La Mina, Barcelona; <sup>4</sup>Sanofi-Aventis, Barcelona; <sup>5</sup>CAP El Raval, Barcelona.

**Objetivos:** Evaluar la asociación entre la medida del perímetro de cintura (PC) y la presencia de alteraciones de la glucosa en España.

**Metodología:** Estudio epidemiológico, transversal, en pacientes que acudieran a la consulta de Atención Primaria y centros Especialistas. Se recogía una historia clínica completa del paciente (análisis sanguíneo, datos antropométricos, antecedentes personales y tratamiento).

**Resultados:** La muestra final evaluable fue de 3.638 (96,4%) pacientes con una edad media de 53,6 años de los cuales 57,9% eran mujeres. El IMC medio fue de 29,1 Kg/m<sup>2</sup> y el 75% de los pacientes presentaba algún tipo de sobrepeso u obesidad. La media del PC y cociente cintura/cadera fue de 94,2 cm y 0,93, respectivamente. En relación a la obesidad abdominal (OA) según ATP III, (p < 0,0001) la frecuencia de OA en mujeres fue de 45,9% y en hombres de 39,2% (p < 0,0001). Al relacionar las medidas antropométricas con las alteraciones en la glucosa (glucosa plasmática en ayunas, GPA > 110 mg/dL), el PC fue el que mostró una mayor correlación (coeficiente de Pearson 0,29; p < 0,0001). Respecto al valor predictivo del PC, el valor de la odds ratio (OR) de presentar alteraciones en la glucosa a partir de un incremento en el PC fue de 1,034; IC95% = 1,027-1,047.

**Conclusiones:** El PC es el parámetro antropométrico que mejor se correlaciona con las alteraciones de la glucosa, y por cada 15 cm de incremento en el PC aumenta el riesgo de presentar alteraciones de la glucosa en un 65%.

### 36

#### RELACIÓN ENTRE OBESIDAD Y PRESENCIA DE DIABETES EN POBLACIÓN ADULTA (> 18 AÑOS) EN LA COMUNIDAD VALENCIANA. DATOS PROCEDENTES DEL ESTUDIO VALENCIA

J. Gorbés Borrás<sup>1,3</sup>, T. Pedro Font<sup>2,4</sup>, M.J. Catalá Pascual<sup>2</sup>, A. Dolz Domingo<sup>2</sup>, M. Adrados Blanco<sup>5</sup>, G. Casanova Alberola<sup>6</sup>, N. Martínez Fernández<sup>7</sup>, A. Bataller Vicent<sup>8</sup> y M. Catalá Bauset<sup>1,4,9</sup>

<sup>1</sup>Directores y <sup>2</sup>Becarios del Estudio Valencia. <sup>3</sup>Unidad de Endocrinología, H. Arnau de Vilanova, Valencia. <sup>4</sup>Servicio de Endocrinología, H. Clínico Universitario, Valencia. Centros de Salud de <sup>5</sup>Denia, <sup>6</sup>Tavernes de Valldigna y <sup>7</sup>Callosa.

<sup>8</sup>Subsecretaría Autonómica de la Conselleria de Sanitat.

<sup>9</sup>Director del Plan de Diabetes de la Comunidad Valenciana.

**Introducción:** La diabetes es un problema creciente de salud pública en todo el mundo. El incremento espectacular de diabetes tipo 2 se acompaña de un aumento alarmante de obesidad, que a su vez es







## JB-37.

### **LA INSULINA INDUCE LA EXPRESIÓN DEL PÉPTIDO INSULINOTRÓPICO DEPENDIENTE DE GLUCOSA (GIP) EN CÉLULAS ENTEROENDOCRINAS USANDO LOS EFECTORES DE LA VÍA WNT.**

J M García-Martínez, **A Chocarro-Calvo**, C García-Jiménez

*Departamento C.C. Salud III Universidad Rey Juan Carlos Alcorcón, Spain*

#### **INTRODUCCIÓN:**

Hasta 80% de la secreción pancreática de insulina en respuesta a glucosa se debe a la acción de las incretinas gastrointestinales, la más abundante es el péptido insulínótropo dependiente de glucosa: GIP.

Importancia: La hiperGIPemia que presentan los pacientes con diabetes tipo 2 (T2D) y familiares de primer grado junto con prevención de la obesidad derivada de la interferencia en la señalización por GIP sugieren que GIP podría ser una diana molecular clave en estrategias preventivas contra la diabetes. El control de la producción enteroendocrina de GIP casi no se conoce.

#### **OBJETIVO:**

Determinar la existencia de bucles de regulación mutua entre la insulina y GIP en células enteroendocrinas.

#### **RESULTADOS:**

La insulina induce la producción enteroendocrina de GIP a través de su promotor utilizando efectores de la vía Wnt.

#### **CONCLUSIONES:**

Hemos identificado un bucle de retroalimentación positiva en que la glucosa facilita la inducción por insulina de la producción enteroendocrina de GIP, además de la estimulación por GIP de la producción pancreática de insulina. Si nuestros resultados son extrapolables la disminución de la glucemia en condiciones normales retornaría los niveles basales de Insulina y GIP mientras que una elevación patológica en los niveles de GIP podría originar hiperinsulinemia. Actualmente estudiamos la influencia de los niveles de glucosa sobre la inducción insulino-dependiente de la producción enteroendocrina de GIP.





PO 0383

## TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF GLUCOSE DEPENDENT INSULINOTROPIC PEPTIDE

García-Martínez JM; **Chocarro-Calvo A**; García-Jiménez C.  
URJC, Alcorcón, Spain

Glucose dependent Insulinotropic Peptide (GIP), an enteric hormone produced by intestinal K cells in response to glucose preserves glucose homeostasis acting at multiple levels and has high potential as therapeutic target for diabetes/obesity. Transcriptional control of GIP synthesis remains obscure.

**Objective:** To understand the control of GIP transcription in enteroendocrine (EE) cells via Wnt (through TCF/LEF-  $\beta$ -catenin) and Protein Kinase A (PKA).

**Experimental model:** STC-1 cell line (from a mouse EE tumor)

**Methods:** Arrays and qRT/PCR for presence/abundance of transcription factors, co-transfections and Luciferase (LUC) assays to evaluate GIP promoter activity. Gel retardation (EMSA) to measure STC-1 extracts binding affinity.

**Results:** 1. We cloned 1921 bp from the 5' flanking region of the mouse GIP gene including 946 bp of the promoter. 2. In silico analysis reveals similarities (well conserved TCF/LEF binding sites) and differences (lacks strong cAMP responsive elements (CRE) targeted by PKA with the closely related promoter of proglucagon (gcg). With LiCl strongly increased GIP promoter. 3. Inhibition of Wnt effector GSK3 $\beta$  activity (LUC assays) and endogenous GIP transcripts (qRT/PCR). 4. Promoter  $\beta$ -catenin reveal three deletions co-transfected with an expression vector for TCF/LEF sites that mediate a 16 fold transcriptional activation: T1 and T2 sites at the 5'untranslated region; T5 in the proximal promoter and strikingly conserved in the gcg promoter. 5. EMSA experiments confirm TCF/LEF proteins from EE cells binding and reference for the T5 site followed by T1 and T2. 6. Directed mutagenesis confirmed the importance of these sites for GIP transcriptional activation. 7. As expected since there is no CRE in the GIP promoter, PKA activation does not affect GIP transcriptional activity but increased 18 fold the expression of gcg control promoter. 8. Cotransfection of catenin induction revealing an  $\beta$ -catenin multiply by 5 the PKA with unexpected synergism. Since there is no CRE in the GIP promoter this synergism might derive from Wnt-PKA crosstalk at another level and we are currently working to define it.

**Conclusion:** We define Wnt-dependent GIP expression in EE cells and report a Wnt/PKA synergism independent of CRE sites.

